



UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Departamento de Ciencias de la Salud

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE
LA SALUD**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE ALCALOIDES PURIFICADOS DE PLANTAS PERUANAS AMAZONICAS

Trabajo Fin de Máster

Martha Milagros Maco Luján

Pamplona-2012

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE ALCALOIDES PURIFICADOS DE PLANTAS PERUANAS AMAZONICAS

Trabajo Fin de Máster presentado por Dña. Martha Maco

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y estimo que puede
ser presentado ante el tribunal que lo ha de juzgar

Pamplona, febrero de 2012

Dr. Ignacio Encío

La autora de este trabajo ha sido financiada
mediante una beca ERASMUS MUNDUS 18.

A Dios, a mis padres José y Martha, a mi esposo
Marcos, y a mis hermanos Gilmer, Jenny y Rosa.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que me han ayudado en la realización de este trabajo:

- Al Dr. Ignacio Encío, por el asesoramiento y orientación en la realización de este trabajo.
- A mis compañeras del laboratorio de bioquímica, Ronces, Idoia, Iranzu y María, por su apoyo en todo momento, gracias chicas.
- A la Dra. Lastenia Ruíz, por su apoyo y sus buenos consejos.
- Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (Iquitos-Perú) y Universidad de la Laguna (Tenerife-España), por proporcionar los alcaloides con los que han sido posible realizar este trabajo.
- A mis profesores por sus enseñanzas y consejos.
- A mis amigos, porque sin su compañía y apoyo hubiera sido más difícil mi estancia acá en Pamplona.
- Quiero agradecer en especial a mi familia, que siempre están apoyándome, aunque estando lejos, su amor y fuerza, me hacían seguir adelante.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
I. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA	6
1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA	7
1.1 Tipo de LLA	7
1.2 Epidemiología	8
1.3 Factores causales	9
1.4 Tratamiento	11
2. APOPTOSIS	18
2.1 Alteraciones morfológicas y estructurales	18
2.2 Mecanismo de apoptosis	21
2.3 Vías de activación de apoptosis	22
3. CICLO CELULAR	25
3.1 Fases del ciclo celular	26
3.2 Regulación del ciclo celular	27
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	30
1. ALCALOIDES	31
2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS ALCALOIDES	32
2.1 Alcaloide de la Vinca	32
2.2 Análogos de Camptotecina	33

2.3 Taxanos	34
2.4 Berberina	35
3. ALCALOIDES A EVALUAR	36
3.1 Alkaloides Indólicos	36
3.2 Alkaloides Quinolínicos	37
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	42
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES	43
2. CULTIVO CELULAR	43
3. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS	44
4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD	44
4.1 Método de reducción del MTT	44
4.2 Procedimiento	45
5. DETECCIÓN DE APOPTOSIS	46
5.1 Método de Anexina V-FICT	46
5.2 Procedimiento	46
6. ANALISIS DEL CICLO CELULAR	47
6.1 Método de Ioduro de Propidio	47
6.2 Procedimiento	48
7. ANALISIS ESTADÍSTICO	49
RESULTADOS	50
1. EFECTO CITOTOXICO	51
2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS	56

3. ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR	59
DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	68

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

Apaf-1: factor activante 1 de protease apoptótica

Asd: compuesto B

Asp: compuesto A

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosina trifosfato

Ca: caboxina A

CARD: dominio de reclutamiento de caspasa

Caspasa: Cistein-aspartato protease.

CCRF-CEM: leucemia aguda T-linfoblástica

CDKs: ciclinas dependientes de quinasas

Ci: cinchonina

CT: tomografía computarizada

DED: dominio efector de muerte

DNA: ácido desoxirribonucleico

DMSO: dimetilsulfóxido

EBV: virus Epstein-Barr

EM: espectroscopia de masas

FITC: isotiocianato de fluoresceína

Ge: geissosreticulina

GI₅₀: inhibición del crecimiento 50

HTLV -1: virus 1 de la leucemia/linfoma de células T

IC₅₀: Concentración de inhibición 50

IP: yoduro de propidio

IR: infrarrojo

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LMA: Leucemia mieloide aguda

LD₅₀: Dosis letal 50

LQ: quinamina

Me: 10-metoxigeissospermidina

MTT: bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolo.

PBS: solución buffer de fosfato.

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

Ph: cromosoma filadelfia

Ph +: cromosoma filadelfia positivo

Qxt: quimioterapia

Re: remijina

RMN:

RNA: ácido ribonucleico

RNAsa: ribonucleasa

Rxt: radioterapia

rpm: revoluciones por minuto

RPMI 1640: medio Roswell Park Memorial Institute

SCF: factor de células madre

SD: desviación estándar

SEM: error típico de la media

TKIs: Inhibidores de la tirosin-quinasa

TK: tirosin-quinasa

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

TRAIL: ligando introductor de apoptosis dependiente del factor de necrosis tumoral.

TGI: Inhibición total del crecimiento

TK: Dominio extracelular con actividad tirosín-quinasa

UV: ultravioleta

XIAP: Inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X

INTRODUCCIÓN

I. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

1. LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA

La Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) es un tipo de tumor, conformado por linfocitos inmaduros (linfoblastos) [1]; en condiciones normales los linfocitos maduros se producen en la médula ósea y en otros órganos del sistema linfático (timo, ganglios y bazo); estos son los encargados de proporcionar inmunidad al cuerpo contra infecciones [2]. En esta enfermedad los linfoblastos, presentan crecimiento rápido y descontrolado, invadiendo el torrente sanguíneo, la médula ósea y el tejido linfático, haciendo que se inflamen [3]. Pueden invadir a otros órganos del cuerpo como los testículos y el sistema nervioso; por ende esta patología requiere de un diagnóstico y tratamiento oportuno e inmediato [4-5].

1.1. Tipo de LLA

La LLA se clasifica de acuerdo al tipo de linfocito que afecta:

1. ***LLA de precursores de linfocitos B (pre linfocitos-B)***: este tipo constituye el 80% de las LLA. En la mayoría de casos, la población más afectada es la infantil, las células involucradas tienden a ser precursoras de linfocitos B, suelen expresar antígenos de superficie como CD10, CD19, CD34 y producen en sangre periférica células pequeñas llamadas L1 [6].
2. ***LLA de precursores de linfocitos T***: representa el 15% de todas las LLA en niños, siendo más frecuente en adolescentes del sexo masculino. Se observa una mayor incidencia en la población adulta (25%), las células afectadas tienden a ser precursores de linfocitos T, en los que se expresan antígenos de superficie como CD2, CD3, CD7, CD34 y TDT y producen en sangre periférica células relativamente grandes comparadas con linfocitos normales a los que se denomina L2.

3. El tercer tipo de LLA involucra linfoblastos B, con anormalidades citogenéticas idénticas a las células del Linfoma de Burkitt. Se denomina L3.

1.2.Epidemiología

La LLA es la enfermedad maligna más frecuente durante la niñez, representando el 23% de los cánceres diagnosticados en niños menores de 15 años. Presenta una tasa anual aproximada de 30 a 40 por millón de habitantes. Por otro lado, el riesgo de que una persona promedio, desarrolle LLA durante su vida es de aproximadamente del 1 ‰ (aproximadamente 1 de cada 1,000 personas). El riesgo es ligeramente mayor en hombres que en mujeres. La tasa actual de curaciones, consideradas todas las formas clínicas, es del 80%. Estos resultados se alcanzan con protocolos complejos, costosos y con una toxicidad no despreciable; protocolos inasequibles a más del 70 % de la población infantil que vive en países con pocos recursos, donde los índices de curación no llegan al 30 %. Las estadísticas de supervivencia global de las personas con LLA son el 66,4 % (todas las edades) y 90,8 % de los niños menores de 5 años.

En países desarrollados como Estados Unidos (EE.UU); aproximadamente 2,900 niños y adolescentes menores de 20 años, son diagnosticados de LLA cada año. La incidencia ha tenido un aumento gradual en los últimos 25 años, observándose un incremento mayor al 80 por millón por año en niños de 2 a 3 años de edad, con tasas que disminuyen a 20 por millón por año en niños de 8 a 10 años. Además la incidencia es 4 veces mayor en niños de 2 a 3 años que en lactantes y casi 10 veces mayor que en adolescentes de 16 a 21 años. Además, también se ha observado que la incidencia es sustancialmente más elevada en la población blanca, siendo casi 3 veces más alta en niños blancos de 2 a 3 años que en niños negros.

En España, cada año se diagnostican alrededor de 400 nuevos casos de LLA en adultos, con una incidencia de hasta 6 veces menor que en niños, sin embargo esta enfermedad es más resistente en adultos, por presentar el cromosoma filadelfia (Ph) y factores de mal pronóstico que determinan una peor respuesta al tratamiento. Se

estima que sólo el 2 % de los niños con LLA tiene el cromosoma Ph+ mientras que en adultos más del 25 % lo presenta [7].

En países en desarrollo como México, esta enfermedad tiene un impacto importante sobre la mortalidad en niños de 1 a 14 años, ocupando el primer lugar entre los cánceres infantiles diagnosticados. La incidencia de LLA se ha venido incrementando durante los últimos años; mientras que en 1982 se detectaban 7 casos por millón en niños menores de 15 años, en 1991 la cifra llegó hasta 22 casos por millón y en el año 2000 a 44 casos por millón. Además en la zona sur de México la incidencia es una de las más altas a nivel mundial, situación que coincide con el de las poblaciones hispanas que viven en EE. UU, donde los niños hispanos de los Ángeles, La Florida y Texas presentan una mayor incidencia que otros grupos étnicos [8].

La Sociedad Americana Contra el Cáncer, avanza que durante el 2011 se habrán producido en los EE. UU alrededor de 5,730 nuevos casos de leucemia linfocítica aguda (LLA), de los cuales aproximadamente 1 de cada 3 será en adultos, así mismo indica que habrá causado alrededor de 1,420 muertes, y que de ésta aproximadamente 3 de cada 4 serán de adultos.

1.3. Factores causales

La LLA no presenta una causa evidente; sin embargo, hay ciertos factores de riesgo que incrementan la probabilidad de padecerla como:

- **Factores Genéticos:** los niños con un gemelo idéntico al que se le haya diagnosticado la enfermedad antes de los 6 años tienen entre un 20 % y un 25 % de probabilidades de desarrollar LLA [9]. Los mellizos y otros hermanos de niños con leucemia tienen también un riesgo entre 2 - 4 veces mayor que la media de contraer esta enfermedad [10]. Además cabe destacar que las deleciones y mutaciones de factores de transcripción linfoides son eventos centrales en la patogénesis de la leucemia linfóide B [11]. Lo mismo sucede en enfermedades congénitas, con alteración de la cromatina (cromatina inestable),

como la Anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, la Ataxia-telangiectasia, la Agamaglobulinemia Congénita, los síndromes de Down y Klinefelter [12-13].

- **Radiación:** se ha descrito un número mayor de casos de leucemia en la población que estuvo expuesta a la radiación de las bombas nucleares durante la 2da Guerra Mundial, alcanzando su pico máximo a los 5-7 años post radiación. También se ha visto una mayor incidencia en pacientes expuestos a radioterapia (Rxt), como tratamiento de otro tumor maligno, especialmente con altas dosis de Rxt, acumuladas en períodos cortos y en personas jóvenes. El riesgo de exposición a niveles bajos de radiación de rayos X o tomografía computarizada (CT) no está bien definido. La exposición del feto a la radiación durante los primeros meses de su desarrollo puede conllevar un mayor riesgo de leucemia, aunque no está claro el grado de este riesgo [14].
- **Factores Químicos:** la LLA se ha asociado con la exposición al benceno [15], que es un solvente usado en la industria del hule, refinerías, plantas químicas y en la fabricación de zapatos e industrias relacionadas con la gasolina, También está presente en el humo del tabaco [16] y en algunos pegamentos, productos de limpieza, detergentes, materiales de arte y disolventes de pintura, aunque esto esta mas relacionado con un aumento en el riesgo de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) que de LLA [17-18].
- **Drogas:** la asociación principal es con medicamentos usados en el tratamiento de otros cánceres (Qxt), variando su incidencia y mecanismo de acción según el tipo de droga específica.
- **Virus:** la infección con el virus 1 de la leucemia/linfoma de células T (HTLV-1) puede causar un tipo raro de leucemia linfocítica aguda de células T. La mayoría de los casos ocurren en Japón y en el área del Caribe. Con más frecuencia, el virus de Epstein-Barr (EBV) causa mononucleosis infecciosa en los Estados Unidos y en África el virus se ha relacionado con el linfoma de Burkitt y la LLA.
- **Raza/grupo étnico:** es más común entre los blancos que entre los afroamericanos, aunque las razones no están claras.
- **Sexo:** es ligeramente más común entre los hombres que entre las mujeres.

1.4. Tratamiento

Los tratamientos antileucémicos, tienen como objetivo la eliminación completa de todas las células cancerosas mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos, genéticos o quimioterápicos. El tratamiento principal para la LLA es la quimioterapia, que se divide en tres fases:

- a. **Inducción:** En esta fase se pretende lograr una remisión de la enfermedad; esto significa erradicar más del 99 % de células leucémicas iniciales y restaurar la hematopoyesis, alcanzando un estado normal; aunque eso no es necesariamente la cura de la enfermedad. Los fármacos incluidos en esta fase son L-asparaginasa, vincristina y un esteroide (usualmente dexametasona). Típicamente se añade un cuarto medicamento de la clase de las antraciclinas (daunorubicina) en los pacientes con alto riesgo. Otros medicamentos que se pueden administrar al principio son metotrexato y/o 6-mercaptopurina [19]. La quimioterapia intratecal: Se realiza mediante punciones espinales, en los que se inyectan los fármacos en el líquido cefalorraquídeo con la finalidad de destruir las células leucémicas que se hubieran propagado al cerebro y la médula espinal. Habitualmente se usa metotrexato. Además se añade en el tratamiento hidrocortisona (un esteroide) y citarabina (ara-C), para los pacientes de alto riesgo [20]. La quimioterapia intratecal, produce como efecto secundario la aparición de convulsiones durante el tratamiento, en el 5 % de los pacientes.
- b. **Consolidación (intensificación):** es la fase más intensiva. Dura de 4-8 semanas. Su finalidad es reducir el número de células leucémicas que quedan tras la primera fase de tratamiento. Se usan combinaciones de medicamentos para evitar que las células remanentes desarrollen resistencia y se continúa con la terapia intratecal. Los pacientes con LLA de riesgo estándar se tratan generalmente con medicamentos como metotrexato y 6-mercaptopurina o 6-tioguanina, aunque los regímenes pueden diferir entre centros de tratamiento de cáncer. También se pueden añadir vincristina, L-asparaginasa y/o prednisona. Por lo general, los pacientes con un alto riesgo de leucemia reciben un régimen de quimioterapia más intenso. Con frecuencia se usan medicamentos adicionales como doxorubicina (adriamicina), etopósido, ciclofosfamida y citarabina (ara-

C) y se sustituye la dexametasona por prednisona. A los pacientes que presentan el cromosoma Ph se les debe añadir un medicamento específico, tal como imatinib, o realizarles un trasplante de células madre.

- c. **Mantenimiento:** si la leucemia sigue en remisión después de la inducción y la consolidación, se puede comenzar la terapia de mantenimiento. La mayoría de los protocolos de tratamiento usan metotrexato y 6-mercaptopurina (vía oral), vincristina (vía intravenosa), y un esteroide (prednisona o dexametasona). Estos dos últimos medicamentos se administran por cortos periodos de tiempo cada 4-8 semanas.

La duración total de la terapia (inducción, consolidación y mantenimiento) para la mayoría de los protocolos de tratamiento de la ALL es de 2 a 3 años.

1.4.1. Principales agentes quimioterapicos

1.4.1.1. Agentes alquilantes y formadores de enlaces con el DNA

Estos compuestos ejercen su acción citotóxica, mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células. Actúan principalmente sobre las bases nitrogenadas del DNA. También reaccionan con los grupos fosfato y alquilan bases del RNA. Los agentes alquilantes alcanzan su mayor nivel de actividad durante la fase de reposo celular. Estos tipos de fármacos no son específicos de ninguna de las fases del ciclo celular [21].

La actividad biológica de las **mostazas nitrogenadas** reside en la existencia del grupo bis-cloretilamina unido a un nitrógeno trivalente. La ifosfamida (Figura 1-a) y ciclofosfamida (Figura 1-b) son agentes alquilantes bifuncionales. La ciclofosfamida también se utiliza como inmunodepresor por vía oral.

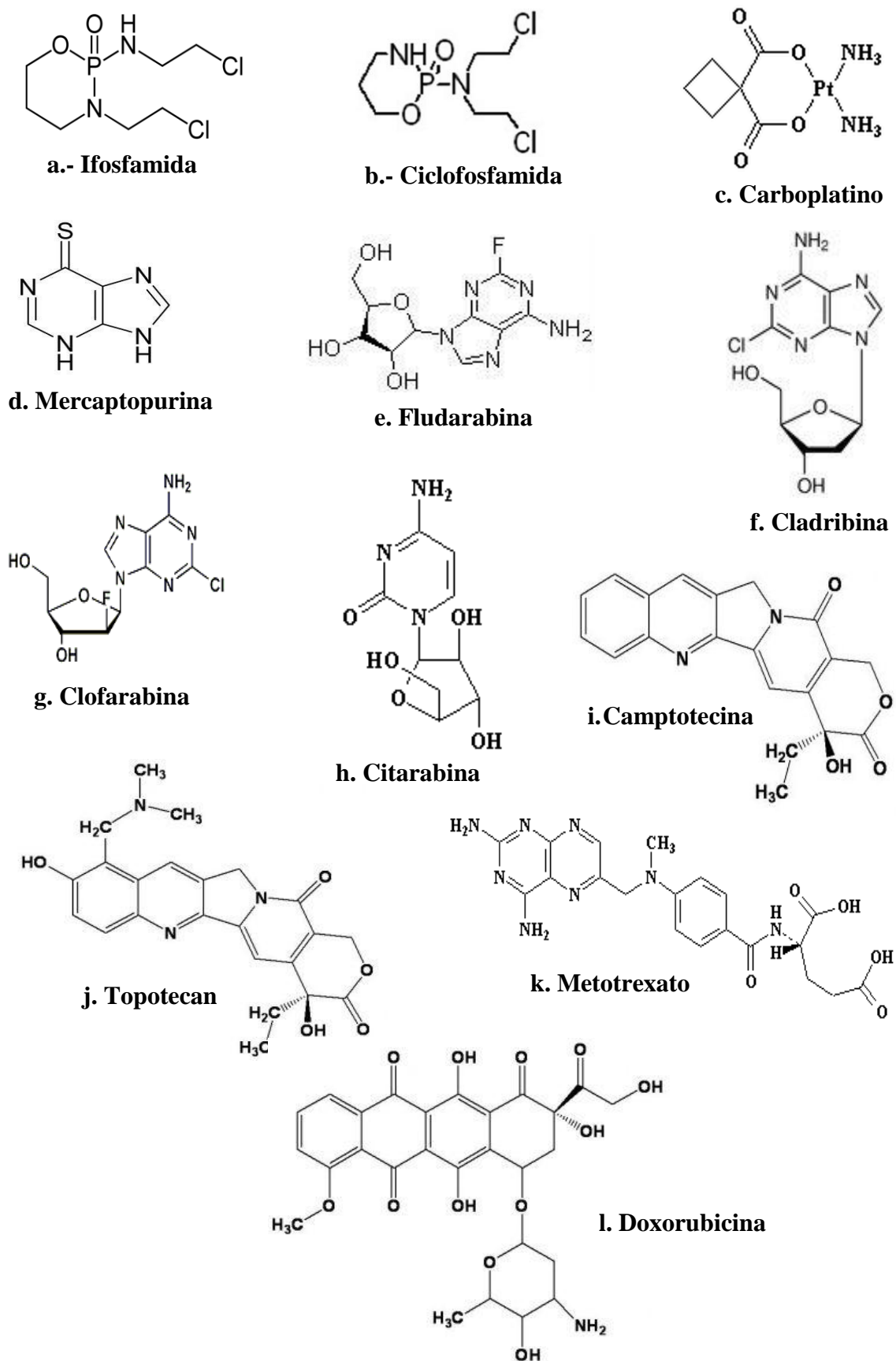
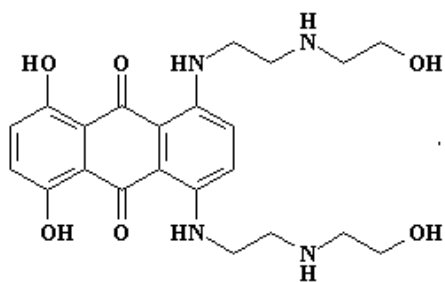
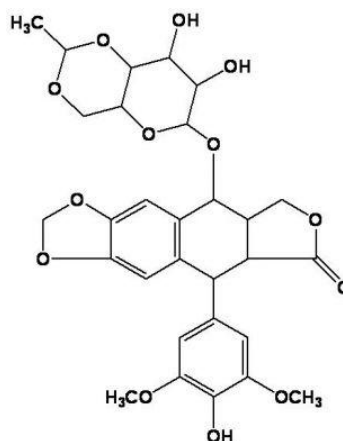


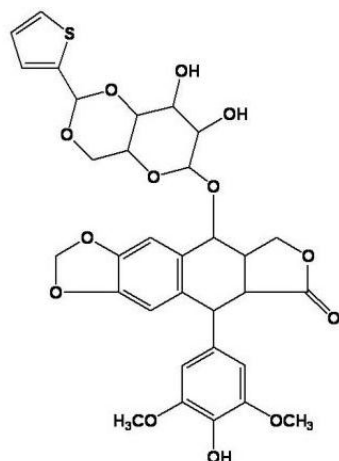
Figura 1: Estructuras de los quimioterápicos utilizados para el tratamiento de la LLA



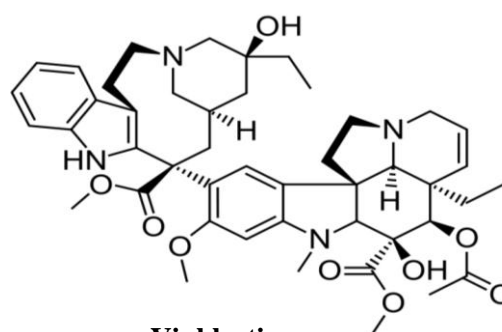
m. Mitoxantrona



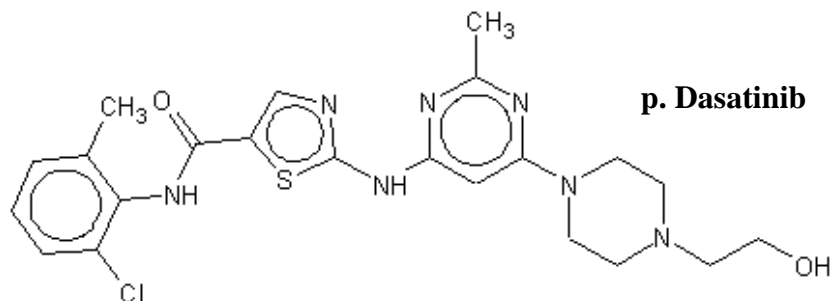
n. Etopósido



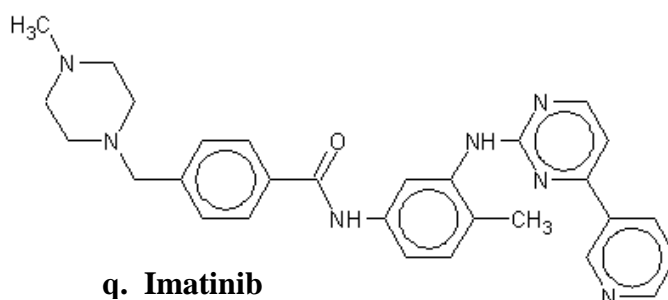
ñ. Tenipósido



o. Vinblastina



p. Dasatinib



q. Imatinib

Figura 1 (continuación): Estructuras de los quimioterápicos utilizados para el tratamiento de la LLA

Los complejos de platino, como el carboplatino (Figura 1-c) reaccionan primero con el N7 de la guanina y para ejercer su efecto citotóxico deben reaccionar con otro nucleófilo y formar puentes inter e intramoleculares.

1.4.1.2. Enzimas que impiden la supervivencia de las células.

Entre las enzimas más utilizadas tenemos, a la **L- asparaginasa** que se obtiene de bacterias como *Escherichia coli*, *Erwinia carotata* y *Serratia marcescens*. Esta enzima hidroliza a la asparagina en ácido aspártico y amoníaco; su citotoxicidad es proporcional a la inhibición de la síntesis proteica [22]. Así mismo tenemos a la **pegaspargasa**, que es una modificación de la L-asparaginasa producida por conjugación covalente de glicol monomethoxypolyethylene (PEG) [23-24].

1.4.1.3. Antimetabolitos

Entre estos compuestos se encuentran los análogos de las bases nitrogenadas y del ácido fólico. Entre los **análogos de las bases puricas** tenemos a 6-mercaptopurina (Figura 1-d) y la 6-tioguanina que son los análogos azufrados de la hipoxantina y la guanina respectivamente. Inhiben la inducción coordinada de las diversas enzimas necesarias para la síntesis del DNA. La 6-mercaptopurina inhibe la glutamino 5-fosforibosil pirofosfato aminotransferasa. También inhibe la interconversión del inosinato a adenilato y del inosinato a xantilato. Y la 6-tioguanina cuando se convierte en su forma activa, tioGMP, inhibe la glutamino 5-fosforibosil pirofosfato aminotransferasa y la ácido inosínico deshidrogenasa [25].

Dentro de este grupo existen compuestos que están en forma de nucleósidos, como la fludarabina (2-fluoro-arabinosyladenine) (Figura 1-e), arabinósido de adenina, que interrumpe la elongación de DNA y RNA e inhibe la actividad de varias enzimas: DNA y RNA-polimerasas, DNA-primasa, DNA-ligasa y ribonucleótido-reductasa. Actúa de manera particular sobre tejido maligno linfoproliferativo. La cladribina (2-cloro-2'-desoxiadenosina)(Figura 1-f) es un

análogo de adenina capaz de inhibir la adenosín-desaminasa. Incrementa la concentración intra y extracelular de la adenosina, causando efectos linfotóxicos e inmunosupresores. También se utiliza un análogo de la segunda generación de 2'-desoxiadenosina llamado Clofarabina (2-cloro-2'-fluoro-2'-deoxyarabinosyladenine) (Figura 1-g) que conecta las actividades bioquímicas de sus prototipos: cladribina y fludarabina. Este nuevo medicamento contra el cáncer es más eficaz (en dosis bajas) e indica mayor biodisponibilidad en comparación con sus congéneres [26]. Diversos estudios indicaron que su mecanismo molecular de acción citotóxica incluye apoptosis de las células, provocada por la inhibición (por los nucleótidos trifosfato de drogas) de la ribonucleótido reductasa y DNA polimerasas [27-28].

Entre los **análogos de las bases pirimidínicas** destacan el arabinósido de la citosina, la citarabina o ara-C (Figura 1-h). Este compuesto inhibe competitivamente la DNA-polimerasa, es enzima responsable del proceso de reparación. Presenta efecto citotóxico específica de la fase S. del ciclo celular.

Entre los **análogos del ácido fólico** el más utilizado es el metotrexato (Figura 1-k) o ametofterina (MTX) que inhibe a la dihidrofolato-reductasa, enzima limitante de la vía que transforma el ácido fólico en ácido folínico, metabolito activo que actúa como cofactor en reacciones de transferencia de grupos monocarbonados. Muestra selectividad parcial por células tumorales y toxicidad contra células normales en división rápida, como los de la médula ósea y el epitelio gastrointestinal. Los antagonistas del ácido fólico destruyen células durante la fase S del ciclo celular y tienen su mayor eficacia cuando inician la fase logarítmica de su proliferación [29].

1.4.1.4. Productos Naturales

A este grupo pertenecen los productos aislados de organismos naturales y sus análogos. Su acción biológica es muy variada, pudiendo actuar sobre las topoisomerasas (enzimas encargadas de prevenir el entrecruzamiento de las hebras de DNA durante la replicación, transcripción y reparación, mediante cortes específicos en su secuencia), los microtúbulos (forman el entramado

celular y tienen, entre otras funciones importantes, la de formar el huso cromático durante la mitosis) y la quinasas dependientes de ciclina (CDKs; contralan los puntos de paso entre las distintas fases del ciclo celular).

Entre los **compuestos inhibidores de la topoisomerasa I** se encuentran los análogos de la camptotecina (Figura 1-i), alcaloide de tipo quinolínic, fue aislado del "árbol de la felicidad" *Camptotheca acuminata*, como el topotecán (Figura 1-j) que presenta buena actividad antitumoral in vitro e in vivo [30].

Entre los **inhibidores de la topoisomerasa II** los más importantes son los antibióticos antraciclínicos y mitoxantronas (Figura 1-m). El primer antibiótico de la serie de antraciclinas fue la daunorrubicina, obtenido de *Streptomyces peucetius*. Posteriormente se obtuvieron su derivado 14-hidroxilado, la doxorubicina (adriamicina) (Figura 1-l) y otros como la Idarrubicina (zevedos). Todos ellos están constituidos por una estructura tetracíclica cromófora unida por un enlace glucosídico a un aminoazúcar. La mitoxantrona es un producto sintético de naturaleza antraquinónica que produce enlentecimiento en la progresión del ciclo celular. En este grupo destacan también los glucósidos sintéticos de la podofilotoxina, extraída del *Podophylum peltatum*, como el etopósido (VP-16; VePesid, Etopophos) (Figura 1-n) y el tenipósido (VM-26; Vumon) (Figura 1-ñ) [31].

Entre los **Compuestos que desestabilizan los microtúbulos** destacan los alcaloides de la Vinca, como la vincristina y la vinblastina (Figura 1-o), extraídos de *Vinca rosea*, además de sus análogos semisintéticos como vinorelbina y vindesina. Estos compuestos son alcaloides que se unen a la tubulina impidiendo la polimerización de los dímeros de tubulina e interrumpen la formación de los microtúbulos, que son críticos para la formación del huso en las células que se están preparando para la mitosis. Cuando el complejo tubulina-alcaloide se une a los microtúbulos trae como consecuencia que la célula sea detenida en la fase M del ciclo celular.

Entre los **Inhibidores de tirosin-quinasa (TKIs)** tenemos al mesilato de imatinib de primera generación. Este compuesto es un derivado de 2-fenilaminopirimidina que funciona como un inhibidor específico de una cantidad de enzimas con actividad tirosina quinasa. En éstas ocupa el sitio

activo TK, inhibiendo su actividad; es específico del oncogen Bcr-Abl del cromosoma Ph, de c-kit, del factor de células madre (SCF) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Existen varios compuestos de segunda generación que se han identificado como posibles agentes terapéuticos para la LLA Ph +. Entre estos se incluyen el dasatinib (Figura 1-p) y nilotinib, inhibidores más potentes de Bcr-Abl que el imatinib (Figura 1-q), pero que aún se están evaluando como terapia para la LLA Ph + [32], habiéndose descrito que el dasatinib induce la apoptosis de las células resistentes a nilotinib e inhibe la actividad Lyn quinasa [33].

2. APOTOSIS

La apoptosis también llamada "suicidio celular", o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado, con una serie de características morfológicas, bioquímicas y moleculares determinadas en él que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos como productos citotóxicos o estímulos físicos [34].

La apoptosis puede ser considerada opuesta a la muerte celular por necrosis (Tabla 1), en la que las células son sujetos pasivos irremediablemente abocados a morir. En este sentido, lo distintivo de la apoptosis radica en el control que ejercen las células sobre su propio destino, cuando "deciden" seguir el camino apoptótico. En condiciones normales la apoptosis constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo [35].

2.1. Alteraciones morfológicas y estructurales

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Dentro de las alteraciones morfológicas (Figura 2) tenemos:

Tabla 1: Diferencias entre los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis

Aspectos	Muerte por apoptosis	Muerte por necrosis
Significado	Fisiológica y Patológica	Patológica
Estimulo	Hipoxia ligera, ausencia de factores de crecimiento,	Isquemia, toxinas, falta de ATP,
Morfología	Disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos.	Aumento del volumen celular, lisis del núcleo y la célula, destrucción de orgánulos.
Ruptura del DNA	Internucleosomal	Aleatoria
Membrana plasmática	Alteraciones en su composición, arrugamiento, mantenimiento de la integridad hasta estadios tardíos.	Lisis
Mitocondrias	No afectadas	Hinchadas
Fase latente	Horas	Minutos
Final del proceso	Fagocitosis de cuerpos apoptóticos	Reacción inflamatoria
Histología	Desaparición de células aisladas, sin señales histológicas residuales.	Desaparición celular masiva, restos de inflamación, cicatriz fibrosa.

1. Alteraciones nucleares: se observa que la cromatina se condensa formando unos grumos densos que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear, esta permanece intacta, aunque se produce una redistribución de los poros nucleares. Estos cambios se asocian con alteraciones de proteínas nucleares que son degradadas. También existe afección en la topoisomerasa, las lamininas o las proteínas nucleares reguladoras de la mitosis [36-37].

2. Alteraciones de la membrana citoplasmática: si bien la apoptosis se asocia con la falta de afección de la membrana citoplasmática, lo cierto es que la membrana celular se deforma y sufre numerosos abombamientos con aspecto de burbujas. Las cisternas del retículo endoplásmico se ensanchan y fusionan, los fosfolípidos de la membrana celular cambian de orientación con paso de la fosfatidilserina, de la cara interna de la membrana a la cara externa, lo que *in vivo* permite a los macrófagos reconocer específicamente las células apoptótica en los tejidos y retirarlas [38]; en los estadios finales, se observan trozos de

membrana celular que se rompen formando los denominados cuerpos apoptóticos. Éstos están constituidos por restos de citoplasma rodeados de membrana celular y son eliminados al entorno extracelular, donde son endocitados por células fagocíticas, lo que evita la lesión y la consiguiente respuesta inflamatoria.

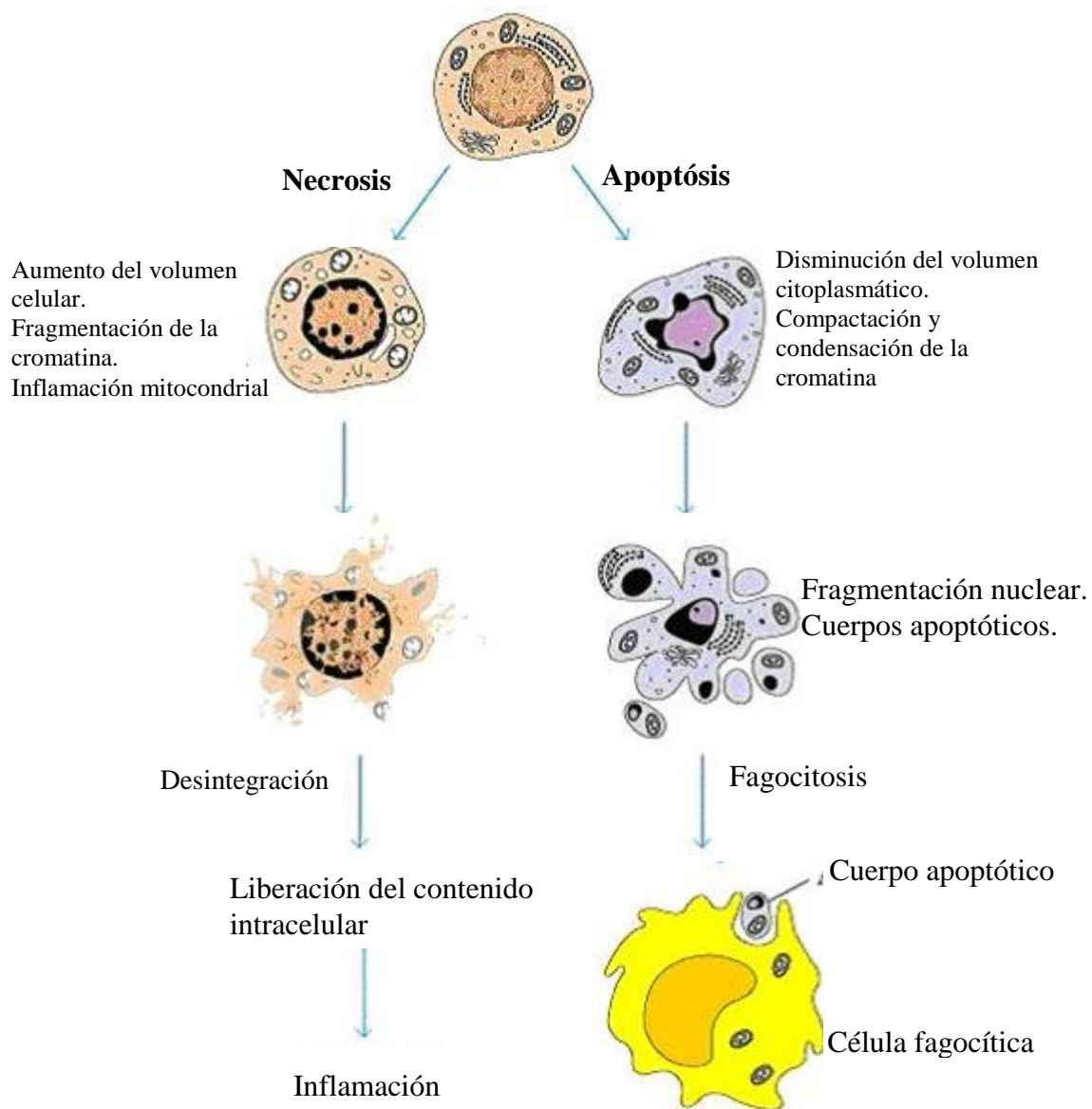


Figura 2: Alteraciones morfológicas de células durante el proceso de necrosis y apoptosis

3. Alteraciones mitocondriales: Una de las alteraciones más tempranas de la célula apoptótica es una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial.

Estas alteraciones preceden los cambios de la superficie celular o la fragmentación del DNA, debido a una ruptura internucleosomal del DNA. Asimismo, el retículo endoplasmático de estas células sufre un ensanchamiento y acaba desestructurándose.

Si este proceso se da en tejidos *in vivo*, estas células son retiradas de manera eficiente por los macrófagos, por lo que no se producen fenómenos de inflamación, pero si la apoptosis ocurre *in vitro*, las células continúan el proceso, que termina en lo que se ha denominado necrosis secundaria.

2.2. Mecanismo de apoptosis

El apoptosis se produce por la activación de una cascada de enzimas: las cisteín-proteasas perteneciente a la familia de las CASPASAS que destruyen la célula en forma rápida, controlada y silenciosa. El nombre caspasa deriva de su actividad enzimática, la “C” representa al aminoácido cisteína y “ASPASA” la acción catalítica de hidrólisis que induce la cisteína sobre el aminoácido ácido aspártico o sus enlaces produciendo la ruptura de la proteína o polipéptido.

Las caspasas se sintetizan como pro-enzimas o procaspasas, las cuales una vez activadas actúan sobre otra caspasa en una reacción secuencial en cadena. Muchas de estas procaspasas presentan un dominio C - terminal hidrofóbico que le permite anclarse en diferentes membranas ya sea citoplasmáticas, mitocondriales, retículo endoplásmico y nuclear donde ejercen su acción de muerte celular.

Entre las caspasas que producen apoptosis se diferencian dos grupos: las caspasas iniciadoras como son las caspasas 2, 8, 9 y 12 y caspasas efectoras donde se encuentran las caspasas 3, 6 y 7 [39].

Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio mayor que las caspasas efectoras, que contiene dominios como los de reclutamiento y activación de caspasas (CARD) en el caso de caspasa 2 y/o 9, o efectores de muerte celular (DED) en el caso de caspasa 8 y 10, que le permite interactuar con otras moléculas que regulan su activación. Estas moléculas responden a estímulos, ocasionando el agrupamiento de

las caspasas iniciadoras, lo que les permite autoactivarse y así proceder a activar a las caspasas efectoras. En todos los casos estudiados, la enzima madura es un heterotetrámero que contiene dos heterodímeros p20/p10 y dos centros activos. Las caspasas efectoras modifican una serie de proteínas clave de la célula causando las transformaciones morfológicas asociadas a la muerte de las células apoptótica.

Entre las proteínas sustrato más conocidas de las caspasas efectoras están las lamininas situadas en la superficie interna de la membrana nuclear. Su ruptura está implicada en la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. Por otra parte, la ruptura por parte de las caspasas efectoras del inhibidor de la DNAsa activada por caspasa, libera esta DNAsa que fragmenta el DNA cromosómico. Finalmente, la ruptura de proteínas del citoesqueleto, catalizada por las caspasas, lleva a la fragmentación de cuerpos apoptóticos.

2.3. Vías de activación de apoptosis

Existen dos vías principales que se activan para producir apoptosis, estas son la vía intrínseca que se depende de cambios en la mitocondria y la extrínseca que es activada por señales extracelulares que actúan vía receptores de muerte (Figura 3).

✓ Vía intrínseca o mitocondrial

En la mitocondria normalmente las proteínas de la familia de Bcl-2 (B-cell leukemia-2) ejercen su acción regulando la apoptosis. Todas ellas tienen en común uno a varios motivos estructurales homólogos denominados dominios BH (Bcl-2 homology). Estos dominios son esenciales para su función y permiten la formación de homodímeros o heterodímeros entre los miembros de esta familia [40]. Estas proteínas pueden agruparse en dos categorías:

Proteínas antiapoptóticas: la mayoría de ellas contiene cuatro dominios BH1, BH2, BH3 y BH4, este grupo conocido como subfamilia Bcl-2 incluye, entre otras, a la propia Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w y Mcl-1.

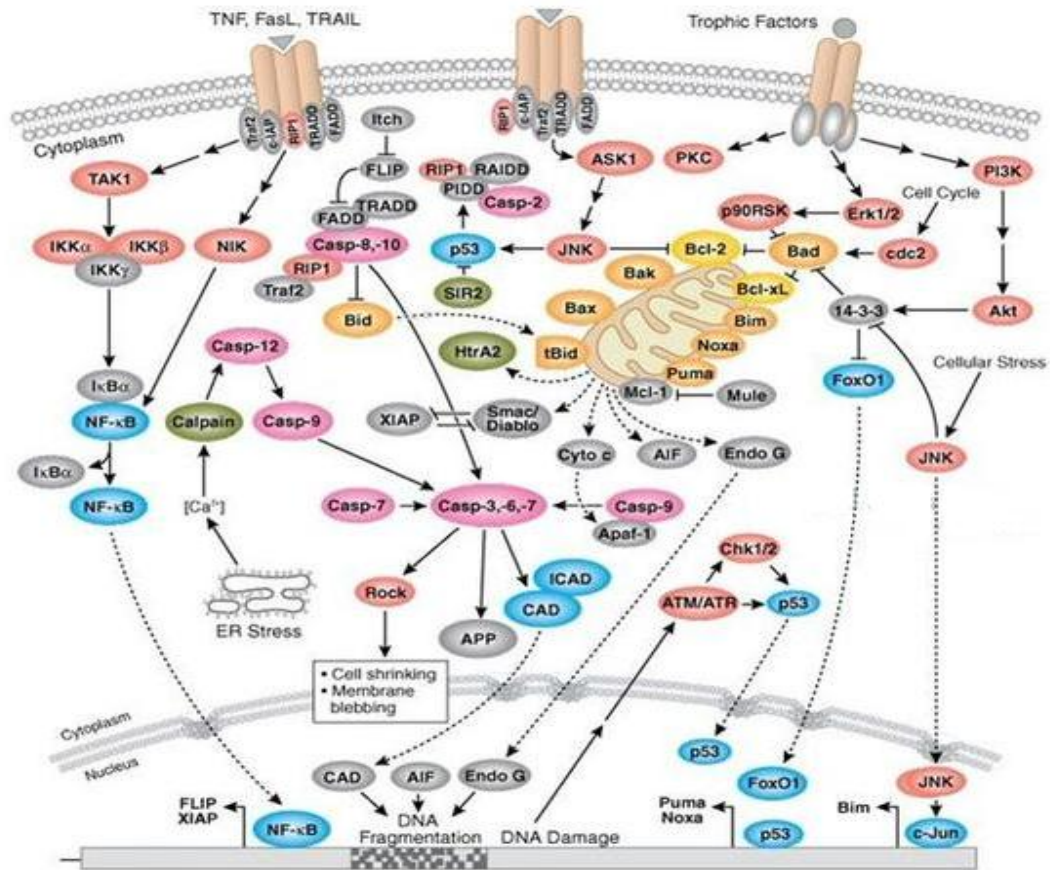


Figura 3: Vías intrínseca y extrínseca de activación de la apoptosis. (Tomada de: <http://www.mailxmail.com/curso-enfermedad-cancer/apoptosis-muerte-celular-programada>)

Proteínas proapoptóticas: carecen de dominio BH4 y se subdividen en la subfamilia Bax integrada por Bax, Bak y Bok, que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3 y la subfamilia BH3, también conocida como BH3-only, que posee únicamente el dominio BH3. A esta subfamilia pertenecen Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, NOXA y Puma [41].

En esta vía las señales que inducen la apoptosis se origina dentro de la célula, en la mitocondria. Algunos autores la han llamado vía apoptótica activada por estrés, ya que se induce por diversas señales de estrés celular, como daño en el DNA, estrés oxidativo, o excesivo calcio intracelular. El paso fundamental es el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, por la activación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2; lo que lleva a la liberación de una serie de proteínas proapoptóticas fuera de la mitocondria. La mejor caracterizada de estas proteínas es el citocromo c, el cual una vez en el citosol, se une a la proteína Apaf-1 (apoptosis-inducing factor 1). Esto

permite el reclutamiento de procaspasa-9, formándose un complejo supramolecular denominado apoptosoma. En dicho complejo se produce la activación de la caspasa 9, la cual activa a las caspasas efectoras 3 y 7. La caspasa 3 activa a su vez a la caspasa 6 [42-43]. Otra proteína liberada es Smac/DIABLO, esta proteína inactiva al inhibidor de las caspasas 9, 3 y 7, XIAP (X-chromosoms-linked inhibitor of apoptosis), permitiendo, de esta manera, la activación de las caspasas, y por tanto, la degradación de proteínas características de la apoptosis [44].

Esta vía puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa 8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9, por tanto Bid conecta a la vía intrínseca con la extrínseca de inducción de apoptosis [45].

✓ **Vía extrínseca o de los receptores de muerte**

Esta vía establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína [39]. Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de muerte (death domain, DD). Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula que los posee [46].

La proteína transmembrana más estudiada y relevante en inmunología es Fas o CD95, en su porción intracelular enlaza con un factor intermedio denominado FADD (factor associated death domain) o Mort 1, nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula Fas que participa en la muerte celular, activando las caspasas-8 y -10. Esta vía Fas permanece inactiva hasta

que se produce en su parte externa el enlace con un cofactor llamado ligando Fas, proteína que actúa como detonador que enciende una vía en que sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparado para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores.

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con proteínas como Tradd (TNF receptor associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis.

3. CICLO CELULAR

La célula puede encontrarse en dos estados claramente diferenciados: el estado de división o mitosis y el estado de no división o interfase. Cuando la célula se divide entra en el llamado ciclo celular, proceso ordenado y repetitivo en el tiempo en el que la célula proliferante crece y se divide en dos células hijas. Puede considerarse como una sucesión continua de estados que se diferencian entre sí en la cantidad de material genético existente en el núcleo de la célula [47].

Los acontecimientos más importantes dentro del ciclo celular son aquellos que tienen que ver con la replicación del genoma y la segregación de los genomas replicados en las dos células hijas formadas en la división, las cuales reciben idéntica información cromosómica.

El programa de síntesis de macromoléculas está perfectamente organizado a lo largo del ciclo; la síntesis de RNA y proteínas se inician inmediatamente después de la división celular y procede de forma continua hasta la siguiente división. Sin embargo, la réplica del DNA tiene lugar durante un periodo concreto. Teniendo en cuenta este momento, el ciclo celular se divide en cuatro fases (Figura 4).

La duración del ciclo celular varía de acuerdo a la estirpe celular, siendo la duración media 24 horas.

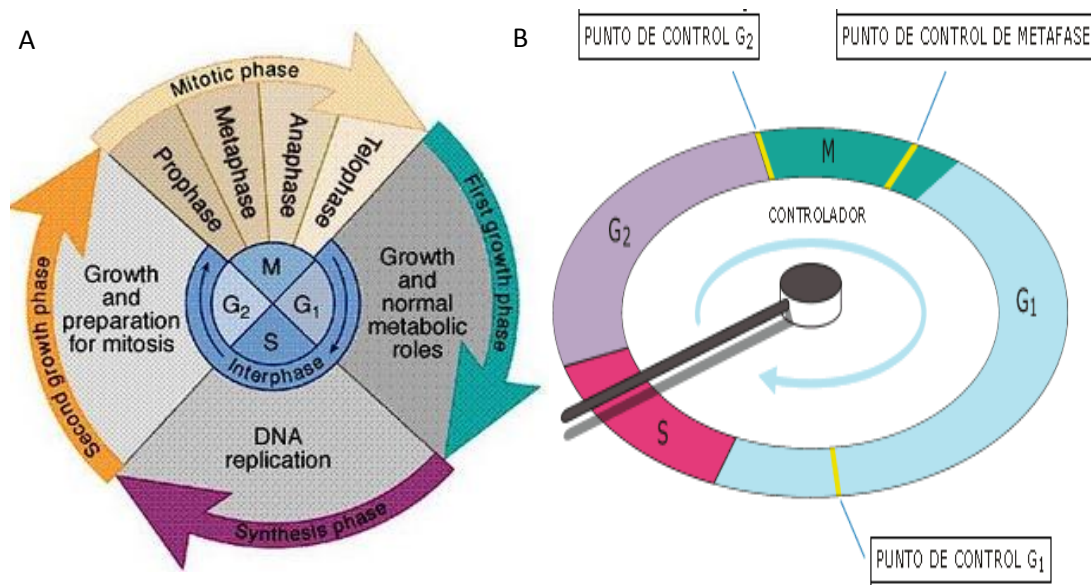


Figura 4: (A) Fases del ciclo celular y (B) puntos de control de cada fase. (Tomado de: (A) <http://eluniversobajoelmicroscopio.blogspot.com/2012/01/ciclo-celular.html> y (B) http://recursos.cnice.mec.es/biologia/bachillerato/segundo/biologia/ud03/02_03_04_02_021.html)

3.1. Fases del ciclo celular

- ✓ **Fase G₁** (del inglés Growth o Gap 1): Es la primera fase del ciclo celular, es el período que transcurre entre el fin de una mitosis o nacimiento de la célula y el inicio de la síntesis de DNA, durante este periodo la célula con su carga cromosómica $2n$, duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de RNA, proteínas y todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Esta fase suele dividirse en temprana y tardía por el punto de restricción R (punto de control G₁), en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria y que las condiciones ambientales son favorables. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas [48].
- ✓ **Fase S** (del inglés Synthesis): Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del DNA, la dotación cromosómica de $2n$ al comienzo pasa a $4n$ al final de la fase; cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas unidas por un centrómero. Con la duplicación del

DNA, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de DNA que al principio. Tiene una duración de unos 6 a 8 horas.

- ✓ **Fase G2** (del inglés Growth o Gap 2): Esta fase empieza cuando todo el DNA se ha duplicado, y la célula presenta dos juegos diploides completos de cromosomas ($4n$) y finaliza cuando comienza la mitosis. En este periodo existe el punto de control G2/M, en donde la célula comprueba si se ha duplicado la masa, para poderse dar las dos células hijas, y que ha completado la replicación del DNA, solo una vez y sin errores. Tiene una duración entre 3 a 4 horas.
- ✓ **Fase M** (mitosis y citocinesis): En esta fase ocurre la división nuclear, y esta incluye 4 subfases: profase, metafase, anafase, telofase. La mitosis finaliza con la citocinesis, que se inicia en la telofase; en donde se segmenta el citoplasma dando lugar a dos células nuevas. En esta fase existe el punto de control M, que comprueba la correcta alineación de todos los cromosomas. Este proceso dura aproximadamente 1 hora.

Además de estas 4 fases típicas de las células en proliferación, existe una quinta fase llamada G0, en la cual las células se encuentran en quiescencia (células no proliferativas), que han abandonado el ciclo celular activo. En esta fase la célula con una dotación cromosómica de $2n$ (similar a G1), mantiene su actividad basal de síntesis de RNA y proteínas necesarias para el adecuado recambio molecular. En esta fase las células pueden pasar días, semanas o años.

3.2. Regulación del ciclo celular

El control del ciclo celular se realiza por dos familias de proteínas: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Figura 5).

✓ **Ciclinas y Quinasa dependientes de ciclinas**

Los componentes centrales del sistema de control del ciclo son miembros de una familia de proteínas quinasas conocidas como quinasas dependientes de ciclinas

(CDKs). Las actividades de estas quinasas aumentan y disminuyen conforme la célula progresa a través del ciclo celular llevando a cambios cíclicos en la fosforilación de proteínas intracelulares que inician o regulan los principales eventos del ciclo celular. Los cambios cíclicos en la actividad de las CDKs están controlados por otras proteínas que regulan a estas quinasas. Las más importantes son las proteínas conocidas como ciclinas. Las CDKs, como su nombre indica, para su actividad son dependientes de ciclinas; a menos que estén fuertemente unidos a una ciclina, no tienen actividad proteína quinasa.

Hay 4 tipos de ciclinas que se unen a las CDKs y actúan en fases específicas del ciclo celular: 1) Ciclina D (D1, D2, y D3), que actúa en la fase G₁; y se unen a CDK 4 y 6; 2) Ciclina E (E1 y E2), que actúan al final de la fase G₁ y en la intersección G₁/S, se unen a CDK2; 3) Ciclina A (A1 y A2), que actúan en la fase S y principios de la fase G₂ se unen CDK2 y a CDK1; 4) Ciclina B (B1 y B2), que actúan en la fase G₂, se unen a CDK1. Cada una de estas ciclinas se unen preferentemente a una o dos CDKs concretas.

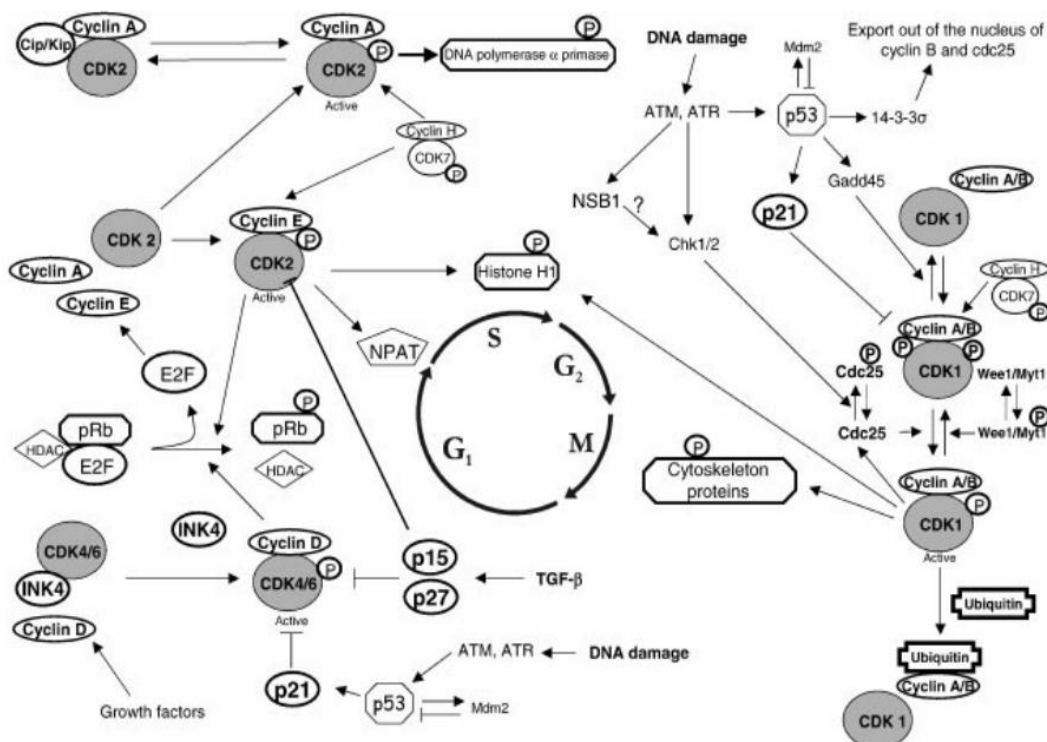


Figura 5: Regulación del ciclo celular por proteínas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas.

(Tomada de: Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N., *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell proliferation* 2003, 36, (3), p 133)

Cada complejo ciclina–CDK fosforila a un grupo diferente de proteínas sustrato. Así, en la fase G1 los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6 fosforilan la proteína de susceptibilidad al retinoblastoma (pRb), provocando la disociación del complejo pRb-E2F y, por tanto, la liberación del factor de transcripción E2F, que es necesario para la expresión de genes que son esenciales para la transición a la fase S; estos incluyen entre otros los genes de la ciclina A, la DNA polimerasa α , la timidina quinasa o la timidilato sintasa.

Al final de la fase G1 el complejo ciclina E-CDK2 sustituye a los complejos ciclina D-CDK4/6 fosforilando a pRb y manteniendo el mismo efecto. Por otra parte en complejo A-CDK2, fosforilado varia proteínas sustrato, induce su unión al complejo de replicación y el inicio de la replicación, lo que permite la entrada y la progresión de la célula a través de la fase S.

Finalmente, en la transición G2/M, los sustratos fosforilados por el complejo ciclina B-CDK1 son bien conocidos. Entre estos se encuentran las proteínas de la lámina nuclear, cuya fosforilación provoca el desmantelamiento de la lámina dando como resultado la ruptura de la envoltura nuclear y la condensación de la cromatina, procesos que suceden al comienzo de la mitosis.

II.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

1. ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos derivados del metabolismo secundario de las especies vegetales, representan una de las familias más grandes y diversas de productos naturales, con una gran variedad de estructuras químicas con actividades farmacológicas.

La definición del término alcaloides ha sido siempre una controversia: puesto que no hay otra clase de productos naturales que exhibe una variedad y complejidad estructural que no permite agruparlos en base a un origen biogenético común [49].

El termino alcaloide que significa análogo de álcali, fue utilizado por primera vez por el farmacéutico W. Meissner en 1819, quien definió como alcaloide, a los compuestos activos con cierta basicidad que forman parte de los vegetales. Luego en 1910 los investigadores Winterstein y Trier; definieron a los alcaloides como compuestos básicos nitrogenados de origen animal o vegetal. En la actualidad es un grupo de compuestos orgánicos que tienen como característica común la presencia de uno o varios átomos de nitrógeno formando parte integral de su estructura, generalmente heterocíclica. Los nitrógenos son procedentes del metabolismo de aminoácidos; cuando proceden de otra vía se denominan pseudoalcaloides.

Estos compuestos son de importancia biológica por su mimetismo hormonal y su intervención en las reacciones principales del metabolismo celular; a pesar de ser sustancias poco similares entre ellas desde el punto de vista estructural, poseen propiedades fisiológicas análogas. Así mismo, diferentes autores [50], han propuesto muchas definiciones de alcaloides, pero no existe una que abarque a todas de forma generalmente aceptada. Por otro lado los primeros ensayos en la farmacología experimental, se inician con el estudio de los alcaloides.

Existen muchas especies vegetales que en su composición poseen alcaloides además de otras metabolitos. Entre las familias de plantas que contienen alcaloides destacan: Amarillidaceae, Annonaceae, Apocinaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Buxaceae, Celastraceae, Fabaceae, Lauraceae, Liliaceae, Loganiaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae y Solanaceae [51].

Estos compuestos han sido de interés para muchos investigadores, por lo que actualmente, existen aislados 2700 alcaloides de plantas, hongos, organismos marinos y mamíferos, de los cuales 2120 son derivados de plantas.

Los alcaloides constituyen un grupo de productos naturales muy importantes en la química, la industria y la medicina; en esta última se vienen utilizando en diferentes patologías por sus diversos efectos farmacológicos como: analgésicos narcóticos (codeína y morfina) y anestésico local (cocaína), antihipertensivos (reserpina), antimaláricos (quinina), antitusivo (codeína), supresor de la gota (colchicina) y antitumorales (vincristina).

2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS ALCALOIDES

Actualmente, los productos naturales están siendo redescubiertos, como herramienta importante para la búsqueda de nuevas moléculas prototipo o cabeza de serie, para la elaboración de fármacos antitumorales, debido a las complejas estructuras moleculares que presentan, capaces de interactuar con los receptores de células de mamíferos. Así mismo, en el esquema terapéutico para la LLA destacan entre los fármacos que se utilizan los alcaloides de la vinca y análogo de la camptotecina (topotecán), los cuales presentan ensayos pre clínico y clínico, pero existen otros alcaloides que aun están en estudios *in vitro* como la berberina.

A continuación detallare, los alcaloides aislados de especies vegetales, que *a priori* han demostrado su actividad antitumoral, como:

2.1. Alcaloide de la Vinca

Fue aislado de *Catharanthus roseus* G. Su efecto antitumoral fue descubierto por casualidad. Cuando los investigadores realizaban la búsqueda de antidiabéticos, notaron una reducción en el recuento de glóbulos blancos y la destrucción de la

medula ósea en ratas inyectadas con extracto de *C. roseus*. Noble, Beer y Cutts, aislaron el alcaloide vincaleucoblastina, que luego fue acortado a vinblastina. Svoboda y colegas usaron *C. roseus* como fuente para aislar vinblastina, y otros alcaloides relacionados como leurocristina, que luego llamaron vincristina. Posteriormente analizaron la capacidad citotóxica de estos alcaloides observando que se debe a su capacidad de unión a la tubulina, por lo que bloquea el proceso de mitosis y provoca que el ciclo se pare en metafase con dispersión y desorganización del material cromosómico [52]. En 1962, se establecieron las estructuras de los alcaloides por interpretación de espectro¹H RMN. Estos alcaloides bis-indólicos contienen estructuras similares con una unidad de catharatina y vindolina, con diferencia del grupo N-metil para vinblastina y N-formil para vincristina [53].

Actualmente el sulfato de vincristina es utilizado en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, en combinación con otros oncolíticos; además se usa para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas malignos no Hodgkin, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, tumor de Wilms, sarcoma osteógeno y cáncer de mamá. Este alcaloide puede producir efectos secundarios como neurotoxicidad, leucopenia, anemia y trombocitosis temporal.

2.2. Análogos de Camptotecina

La camptotecina, fue aislada por primera vez en el año 1958 por M.E. Wall y M.C. Wani mientras estudiaban de forma sistemática productos naturales que tuvieran propiedades anticancerosas. Su estructura se determinó en 1966. Es un compuesto pentacíclico constituido de un fragmento de indolizina-[1,2-b]-quinolina (ciclos A, B, C y D) fusionado con una α -hidroxilactona de seis eslabones. El carbono en posición 20, que lleva el grupo α -hidroxi, es asimétrico y confiere a la molécula un poder rotativo. La forma natural de la camptotecina posee la configuración absoluta “S” en el carbono 20. Se obtiene de la corteza y las hojas del árbol de origen chino *Camptotheca acuminata* y su acción se debe a la inhibición de la enzima topoisomerasa I [54].

La síntesis de este compuesto radica en la importancia de crear análogos de este, entre ellos tenemos al Topotecan, que es un derivado semisintético de la camptotecina como base con un grupo funcional de N,N-dimetilaminometil en el C-9 que le confiere a la molécula solubilidad en agua; es utilizado para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda [55-56], del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de cuello de útero. Actúa produciendo la inhibición de la enzima topoisomerasa-I que está implicada en la desenrollamiento del DNA, proceso previo a su replicación, dificultando de esta manera la división y multiplicación de las células tumorales. Sus principales efectos secundarios son leucopenia, anemia, trombopenia, vómitos, diarrea, erupciones en la piel y alopecia.

2.3. Taxanos

Los Taxanos son una clase de alcaloides diterpenos estructuralmente complejos pero homogéneos que se producen en el género *Taxus*, comúnmente conocido como tejo. Esta familia de diterpenos ha sido conocida durante mucho tiempo por su toxicidad, así como por otras actividades biológicas. El farmacéutico alemán Lucas obtuvo en 1856, una mezcla de taxanos caracterizando su estructura mediante técnicas modernas de espectroscopia, y nombrándolos como taxina. En 1963, se estableció el núcleo de taxano como taxinina. Hasta la fecha hay más de 100 taxanos pero el más importante por su actividad antitumoral es paclitaxel también llamado taxol [57].

El paclitaxel fue aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt; es un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, y por ende inhibidor de la mitosis y el proceso de división celular [58]. Además, estimula la apoptosis [59], o muerte celular programada, que a menudo es inhibida en células cancerosas. Es utilizado en el tratamiento de cáncer de ovario, mamá, pulmón, estomago, próstata y testículo. También se ha estudiado su efecto anti-cancerígeno en leucemia mieloide aguda. Los efectos secundarios que presentan son leucopenia o neutropenia, urticaria,

broncoespasmos, neurotoxicidad, bradicardias, isquemias miocárdicas, arritmias auriculares y taquicardias ventriculares.

2.4. Berberina

La berberina es un alcaloide isoquinolinico con un color amarillo brillante; que se encuentra generalmente en las raíces, rizomas, tallos y corteza de plantas tales como *Berberis aquifolium* (uva de Oregon), *Berberis vulgaris* (agracejo) y *Berberis aristata* (cúrcuma), *Hydrastis canadensis* (sello de oro), *Phellodendron amúrense* (huangbo) y *Coptis chinensis* (huanglian) [60]. Se utiliza contra infecciones de hongos (*Candida albicans*), bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Microcystis aeruginosa*), levaduras, parásitos (Leishmaniasis) y virus [61]. Además reduce los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, reduce la grasa y evita fibrosis en el hígado, suprime el crecimiento de una variedad de células tumorales como cáncer de mamá, de páncreas, de próstata, gástrico, melanoma y leucemia. En estudios *in vitro*, se han demostrado que la berberina presenta efectos anti-cancerígenos, induciendo apoptosis en células de leucemia humana (HL60 y la K562) y células de leucemia de ratón (WEHI-3) [62-63], además se observó que detiene el ciclo celular en la fase G2/M [64]. Otro estudio demuestra que este alcaloide induce la apoptosis en células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) quimioresistentes, por sobreexpresión de la oncoproteína MDM2 [65]. Este alcaloide no es tóxico a concentraciones terapéuticas. A dosis altas puede producir malestar gastrointestinal, disnea, disminución de la presión arterial y daño cardíaco.

3. ALCALOIDES A EVALUAR

3.1. Alcaloides Indólicos

Dentro de este grupo de alcaloides indólicos, evaluamos al **compuesto A (Asp)** (Figura 6-1) y **compuesto B (Asd)** (Figura 6-2) aislado de la corteza de la raíz de *Aspidosperma desmanthum*, además de **10-metoxigeissospermidina (Me)** (Figura 6-3) y **Geissosreticulina (Ge)** (Figura 6-4) aislado de la corteza y las hojas de *Geissospermum reticulatum*. El género *Aspidosperma*, pertenece a la familia Apocynaceae, y se distribuye en el neotrópico; este género es importante por los alcaloides que presenta, principalmente indol- monoterpénico y bis-indólicos, que le dan un amplio espectro de actividad biológica, tales como antitumoral, antiplasmódica y antimicrobiana. Entre estas actividades biológicas, la más representativa es la citotóxica, que ha sido demostrada en diferentes líneas de células tumorales [67]. Según ensayos realizados son compuestos que presentan buena actividad antimalárica, tal es el caso del compuesto A que presenta un IC₅₀ de 7,66 µg/mL [68]. Además de presentar efecto citotóxico moderado frente a células de mamífero (CHO) y una muy alta actividad frente a *L. infantum* y moderada-baja frente a *T. cruzi*.

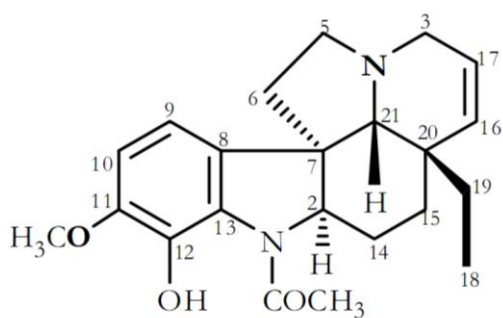
Caboxina A (Ca) (Figura 6-5) un alcaloide oxindólico pentacíclico, aislado de las hojas de *Aspidosperma rigidum*; este compuesto en trabajos anteriores [69-70], presentó bajo efecto citotóxico frente a células de mamífero (CHO) y alta mortalidad frente a *L. infantum* y *T. cruzi*. Diferentes estudios han demostrado, que la presencia de alcaloides oxindólicos pentacíclico, aislado de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato), como pteropodina y isopteropodina estimulan la producción de linfocitos T y B, y modulan positivamente los receptores muscarínicos M1 y 5-HT-2 [71-72]; además pteropodina y uncarina F inhiben la proliferación de las células de leucemia linfocítica aguda (CCPR-CEM-C7H2) induciendo apoptosis [73], también mitrafilina presenta efectos antiproliferativos y citotóxicos frente a células humanas de Sarcoma de Ewing y de cáncer de mama [74]. Los alcaloides pteropodina e isopteropodina, también se han aislado de *Hamelia patens* (Hierba Coral) [75], así mismo, este último se ha encontrado en

Lepidium meyenii (Maca) [76]. Igualmente el alcaloide oxindólico tetracíclico isorhynchophyllina aislado de *H. patens* y *U. sinensi*, presenta efecto protector contra la muerte neuronal por glutamato. En estudios *in vitro* e *in vivo* [77-78], han demostrado el efecto antitumoral y antioxidante del extracto hidroalcohólico de Uña de gato.

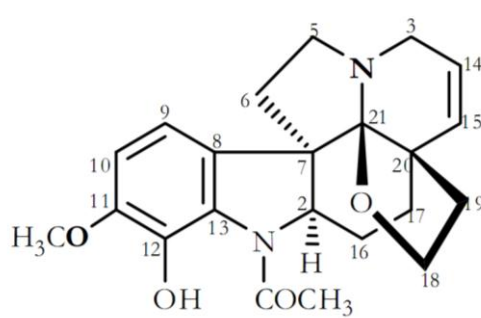
Remijina (Re) (Figura 6-6) y **Quinamina (LQ)** (Figura 6-7) (indol quinoclidinico) aislados de las hojas de *Remijia peruviana*; especie que pertenece a la familia Rubiaceae y se distribuye en los bosques amazónicos y andinos, en los departamentos de Loreto y San Martín (Perú); comúnmente es conocido como “cascarilla”, su corteza es utilizada como antimalárico. Además es una de las familias de alcaloides más estudiadas por sus propiedades farmacológicas, muchos de sus derivados actúan como potentes agentes analgésicos, amebicidas, viricidas y anti cancerígenos [79].

3.2. Alcaloides Quinolínicos

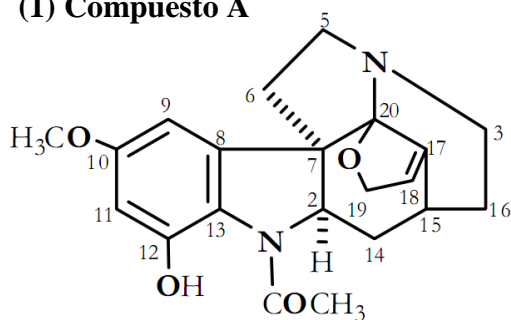
La **Cinchonina** (Figura 6-8), aislados de la corteza de *Remijia peruviana*, este alcaloide demostró tener un efecto potencial en la reversión de resistencia a múltiples fármacos en pacientes con cáncer, y es considerada como la primera generación de bloqueadores [80]. Además presenta efecto antialimentario frente a *L. decemlineata* con EC_{50} de $1,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ relacionado con la configuración (8*R*, 9*S*), también se realizó ensayos de citotoxicidad de este compuesto en CHO (células de ovario de hámster chino), CT26(adenocarcinoma de colon de ratón), SW 480 (adenocarcinoma de colon humano), HeLa (adenocarcinoma de cerviz), SkMe128 y SkMe 125 (melanoma humano) presentando EC_{50} de $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$; $27,1 \mu\text{g}/\text{mL}$; $22,6 \mu\text{g}/\text{mL}$; $1,4 \mu\text{g}/\text{mL}$; $13 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $34,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente [81-82].



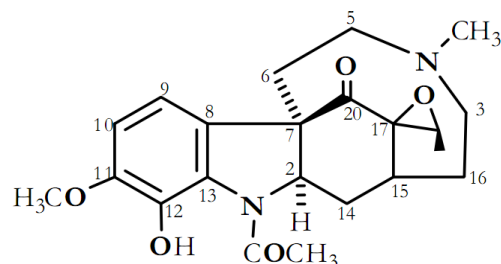
(1) Compuesto A



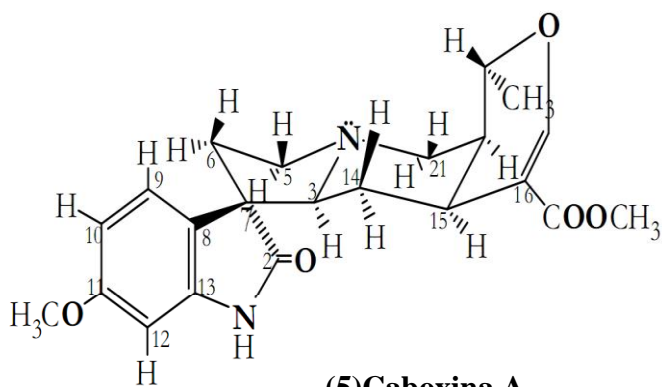
(2) Compuesto B



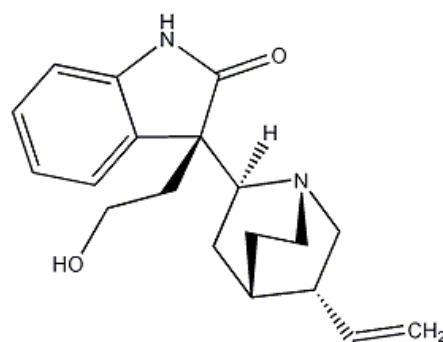
(3) 10-metoxigeissospermidina



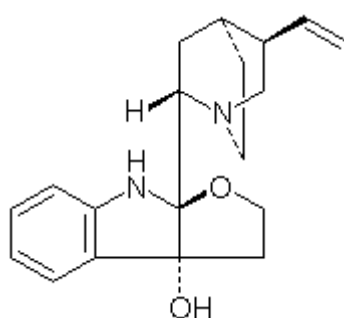
(4) Geissosreticulina



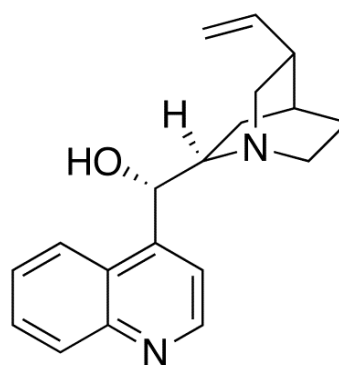
(5) Caboxina A



(6) Remijina



(7) Quinamina



(8) Cinchonina

Figura 6: Estructuras de los alcaloides indólicos y quinolínicos a evaluar

OBJETIVOS

La LLA es una de las enfermedades malignas más frecuente durante la niñez. Representa el 23 % de los cánceres diagnosticados en niños menores de 15 años, con una tasa anual aproximada de 30 a 40 por millón de habitantes. El riesgo de contraer LLA es ligeramente mayor en hombres que en mujeres. La tasa actual de curaciones, consideradas todas las formas clínicas, es del 80 %. Pero en uno de cada cinco enfermos falla el tratamiento. Las estadísticas de supervivencia global de las personas con LLA son el 66,4 % (todas las edades) y 90,8 % de los niños menores de 5 años.

Actualmente el tratamiento más efectivo para esta enfermedad es la detección precoz. En esta fase cada vez surgen importantes avances y mejoras técnicas. Sin embargo estas medidas no están al alcance de toda la población, puesto que para países en desarrollo estas técnicas son muy costosas y además no cuentan con la tecnología punta adecuada. Entre los tratamientos se encuentran la radioterapia, el trasplante de medula ósea y la quimioterapia. Este último es el más utilizado, ya que se dispone de varios fármacos que usados de forma combinada han aumentado la supervivencia en los pacientes. Sin embargo su utilización está limitada por los efectos secundarios que produce, como alopecia, náuseas, neurotoxicidad, leucopenia y neutropenia entre otros. Además es un tratamiento largo (2 a 3 años) y tedioso.

Como consecuencia de los problemas mostrados por los compuestos quimioterápicos durante el tratamiento, es decir de su poca selectividad frente a las células tumorales y de los efectos secundarios que provocan en los pacientes, se ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que sean inocuos y presenten mayor selectividad, eficacia y eficiencia. Entre las distintas alternativas se encuentran los alcaloides, compuestos ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades. Debido a esta necesidad en este trabajo se pretende aportar un avance en el conocimiento de distintos tipos de estructuras alcaloideas, que sirvan como punto de partida para el desarrollo de nuevas moléculas prototipo o cabeza de serie para la elaboración de fármacos antitumorales que en el futuro contribuyan a solucionar este problema. Por ello se pretende:

- Evaluar la actividad citotóxica en la línea celular de leucemia linfoblástica CCRF-CEM de diversos alcaloides de estructura química indólica y quinolílica extraídos de plantas amazónicas peruanas.
- Determinar la capacidad de los más activos de estos compuestos para inducir apoptosis en células CCRF-CEM.
- Analizar si estos alcaloides modifican la distribución del ciclo celular en células CCRF-CEM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES

Los alcaloides seleccionados en este estudio (Tabla 2) han sido extraídos de especies vegetales amazónicas. Su aislamiento e identificación ha sido llevado a cabo mediante técnicas cromatográficas e instrumentales (EM, UV, IR, RMN, actividad óptica y punto de fusión) por investigadores de las Universidades de la Laguna (Tenerife-España) y Nacional de la Amazonía Peruana (Iquitos-Perú) [66, 68, 69, 70, 72 y 73].

Tabla 2: Características químicas de los alcaloides

Alcaloides	Aspecto físico	Formula molecular	Peso molecular
Asp	Resina	$C_{22}H_{30}N_2O_3$	370
Asd	Sólido amorfo	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	384
Me	Cristaliza en n-hexano - acetato de etilo	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	368
Ge	Cristaliza en n-hexano - acetato de etilo	$C_{22}H_{28}N_2O_5$	400
Ca	Sólido amorfo de color amarillo	$C_{22}H_{26}N_2O_5$	398
Re	Cristaliza en acetato de etilo- metanol	$C_{19}H_{24}N_2O_2$	312
LQ	Cristaliza en acetato de etilo-hexano	$C_{19}H_{24}N_2O_2$	312
Ci	Cristaliza en diclorometano-metanol	$C_{19}H_{22}N_2O$	294

2. CULTIVO CELULAR

La línea celular CCRF-CEM (leucemia aguda T-linfoblástica) se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10 % de suero bovino fetal de ternera, L-glutamina (2 mM) y gentamicina (0,1 mg/mL) y se mantuvieron,

en frascos de 75 cm² (Nunctm), a 37°C en una atmosfera con un 5 % de CO₂ y un 95 % de humedad relativa.

Para mantener el crecimiento exponencial los medios se cambiaron cada 48 horas. Con este fin las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron y dividieron por dilución en medio suplementado.

3. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Cada producto se diluyo inicialmente en DMSO (Sigma) a una concentración de 0,01M. Las diluciones obtenidas se esterilizaron por filtración, con filtros de 0,22 µm de diámetro (Millipore), y a continuación se prepararon a partir de las mismas diluciones seriadas utilizando medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar. Los compuestos sólidos y sus diluciones se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

4.1. Método de reducción del MTT

La actividad citotóxica de los compuestos se ha analizado in vitro a través de un microensayo colorimétrico de citotoxicidad basado en la reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolo). En este ensayo las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a una sal de formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. La cantidad de formazán formada en esta reacción, que esta catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, puede cuantificarse espectrofotométricamente con facilidad, lo que permite estimar el número de células vivas y metabólicamente activas presentes en el cultivo.

4.2. Procedimiento

Se emplearon células obtenidas a partir de cultivos en crecimiento exponencial no confluentes. Se comparó el crecimiento de células tratadas durante 72 horas y sin tratar (control de crecimiento) con respecto al número de células sembradas inicialmente. Los parámetros de citotoxicidad se expresan como GI₅₀ (concentración que inhibe el 50 % del crecimiento de las células, TGI (concentración que inhibe totalmente el crecimiento de las células) y LC₅₀ (concentración que mata el 50 % de las células). Dichos datos se obtuvieron por extrapolación en curvas dosis-respuesta a partir de las concentraciones en que los porcentajes de supervivencia son 50 (GI₅₀), 0 (TGI) y -50 (LC₅₀). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes con cada concentración repetida por cuadruplicado en cada uno de ellos.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a. Se añaden 20 µL de las distintas disoluciones de los productos en medio a todos los pocillos de las columnas 3-12.
- b. Se añaden 80 µL de medio de cultivo suplementado a los pocillos que tienen compuesto, 100 µL del mismo medio a los pocillos control (columna 2) y 200 µL a los pocillos blanco (columna 1).
- c. Se añaden 100 µL de una suspensión de células en medio suplementado, de forma que tengamos un número de 40,000 células por pocillo a todos los pocillos excepto los del blanco. De esta manera el volumen total de todos los pocillos es 200µL.
- d. Las placas se incuban en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante el tiempo necesarios (72 horas para los experimentos con compuestos y para la placa t₀ se pasa al apartado e)
- e. Se añaden 50µL de una disolución de MTT (2mg/mL en PBS) a todos los pocillos y la placa se incubar durante 4 horas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂.
- f. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifuga las placas a 1100 rpm x 5 min a 25°C.

- g.** Se aspira el contenido de cada pocillo con un lavador de placas programado de forma que solo quede un volumen de 10 μ L en cada pocillo.
- h.** Se añade 150 μ L de DMSO y la absorbancia se lee en un lector de placas (ELISA Bio Kinetics Reader, BIO-TEK) a una longitud de onda de 550 nm, sustrayendo el valor obtenido a 630 nm para reducir el ruido de fondo.

Los datos obtenidos se expresan como porcentaje celular medio para cada concentración \pm SEM (error típico de la media). Estos datos de crecimiento se calculan a partir de los datos de absorbancia obtenidos utilizándose las siguientes formulas: $[(A-A_0)/(A_c-A_0)] \times 100$ cuando $A \geq A_0$ y $[(A-A_0)/A_0] \times 100$ cuando $A < A_0$, donde A =absorbancia del compuesto; A_0 = absorbancia a tiempo cero; A_c = absorbancia del control. Así, los datos de GI_{50} , TGI y DL_{50} se obtuvieron por extrapolación en las curvas dosis-respuesta y se expresaron en valores micromolar.

5. DETECCIÓN DE LA APOPTOSIS

5.1. Método de la Anexina V-FICT

Para la determinación del porcentaje de apoptosis en la línea celular se utilizo la técnica de tinción conjunta de anexina V unida a isotiocianato (FITC) e ioduro de propidio (IP). El complejo anexina-FICT se une a la superficie celular y su señal se detecta a 525 nm. El ioduro de propidio se introduce en el interior de la célula y se une al DNA, detectándose su señal a 620 nm.

5.2. Procedimiento

Las células se precipitaron por centrifugación. Tras el recuento se cultivaron en placas de seis pocillos ($0,34 \times 10^6$ cs/mL, 3 mL) en presencia o ausencia de los compuestos. Las células en ausencia de compuesto se incubaron en presencia de una cantidad equimolar de DMSO. Al finalizar el periodo de incubación, las células se centrifugaron (1500 rpm x 5 min) y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Las células

se lavaron 2 veces con PBS. A continuación, se procedió al doble marcaje de las células con anexina V-FITC y IP utilizando el kit anexina V-FITC (Pharmingen). en las condiciones descritas por el fabricante. Con este fin, se añadieron 5 μ L de Anexina V-FITC y 5 μ L de IP a una solución de 5×10^5 células en 100 μ L de tampón de carga (BB 1x). Tras 15 min de incubación, a 4°C y en oscuridad, se añadieron 400 μ L del tampón de carga (BB 1x) y se leyeron las muestras en un citómetro de flujo Coulter Epics XL 4-CLR (Beckman Coulter, Florida, USA), analizándose la fluorescencia verde (debida al V-FICT) y la roja (debida al IP) procedente de 10,000 células. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm, la fluorescencia del FITC se detecto a 525 nm y la correspondiente al IP a 620 nm. Los resultados se expresaron como porcentajes de células apoptóticas \pm SD tras el tiempo de incubación. Para cada compuesto se realizaron al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determinó por duplicado.

6. ANALISIS DEL CICLO CELULAR

6.1. Método de Ioduro de Propidio

Usando marcadores fluorescentes de los ácidos nucleídos es posible identificar la proporción de células que están en las distintas fases del ciclo celular al medir por citometría de flujo su contenido relativo de DNA. Ya que el marcador fluorescente que se emplea se une estequiométricamente con el DNA, la intensidad de la señal de fluorescencia que emite es proporcional al contenido en DNA de la célula. La medida del contenido de DNA permite identificar las células que se encuentran en las distintas fases (G_0/G_1 , S y G_2/M) del ciclo celular. Las células que se encuentran en la fase G_0/G_1 (antes de la síntesis de DNA) tienen una cantidad de DNA definida como 1X. Durante la fase S (síntesis de DNA) tienen una cantidad de DNA definida entre 1X y 2X. Dentro de las fases G_2 o M, las células presentan una cantidad de DNA 2X.

El Ioduro de propidio (PI) es el marcador fluorescente del DNA más utilizado. PI se intercala dentro de la hélice de DNA de las células fijadas y permeabilizadas. Debido a que PI también se une al RNA de doble hebra, las células deben ser tratadas con RNAsa para asegurarse que la unión de PI es específica del DNA.

6.2.Procedimiento

Para el análisis del ciclo celular se utilizó el fluorocromo IP (Sigma, Missouri, Mo, USA) que posee la capacidad de unirse esquiométricamente al DNA, permitiendo la cuantificación del DNA intracelular.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos ($0,34 \times 10^6$ cs/mL, 3 mL) durante 24, 48 y 72 horas, en presencia o ausencia del compuesto. Se utilizaron los compuestos a concentración de 40 μ M. Tras la incubación, las células se centrifugaron (1500 rpm, 5min) y se resuspendieron en 1mL de PBS. Se realizó el conteo y se fijó una muestra de 1×10^6 células en etanol al 70 % (en PBS) a 4°C durante 20 min. Se volvieron a centrifugar (4000 rpm, 10 min, 4°C), y se resuspendieron en una solución de PBS que contenía IP (50 μ g/mL) y RNAsa (200 μ g/mL), empleando 1 mL de solución de marcado por cada 10^6 cs. Posteriormente se incubaron durante 30 min a 37°C y en oscuridad. Se centrifugaron, se resuspendieron en PBS (500 μ L/muestra) y se analizaron las muestras mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo Coulter Epics XL 4-CLR (Beckman Coulter, Florida USA). Para cada muestra se analizó la fluorescencia roja (debida al IP) procedente de 10,000 células. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la fluorescencia correspondiente al IP se detectó a 620 nm. Para el análisis del ciclo celular, las células vivas se seleccionaron en una grafica FSC/SSC, se excluyeron los agregados de dos o más células mediante la selección en una grafica FL3/AuxFL3, y las fases del ciclo celular SubG₁, G₀/G₁, S y G₂/M se determinaron en un histograma FL3/nº de células.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación estadística de los resultados, se realizó en cada caso el test de la “U” de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas y para ello se utilizó el programa estadístico SPSS 17.00. Valores de $p < 0,05$ se considera estadísticamente significativo

RESULTADOS

1. EFECTO CITOTÓXICO

En este trabajo se ha analizado la actividad citotóxica *in vitro* de ocho alcaloides de estructura indólica y quinolílica. Con este fin se cultivaron células de la línea celular de leucemia linfoblástica CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de los compuestos a concentración de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM y tras 72 horas de incubación se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7-14 en forma de curvas dosis-respuesta.

Las figuras muestran el mismo patrón para todos los compuestos evaluados, con porcentajes de supervivencia que disminuyen a medida que aumenta la concentración de los compuestos, por lo que puede decirse que todos los alcaloides evaluados poseen un moderado efecto citotóxico con valores de $\text{GI}_{50} < 10 \mu\text{M}$. La única excepción a esta idea es el alcaloide Asp cuya GI_{50} es de 16,44 μM .

Las figuras también muestran que los alcaloides Ca y Re son los de mayor toxicidad, con valores de GI_{50} de 2,75 μM y 2,41 μM respectivamente. Estos valores muestran una mayor actividad citotóxica para estos compuestos que la encontrada en estudios similares realizados con los alcaloides Saprosmína A y Saprosmína B en células de leucemia mieloblástica K562 (GI_{50} de 51,9 y 53,6 μM respectivamente) [83].

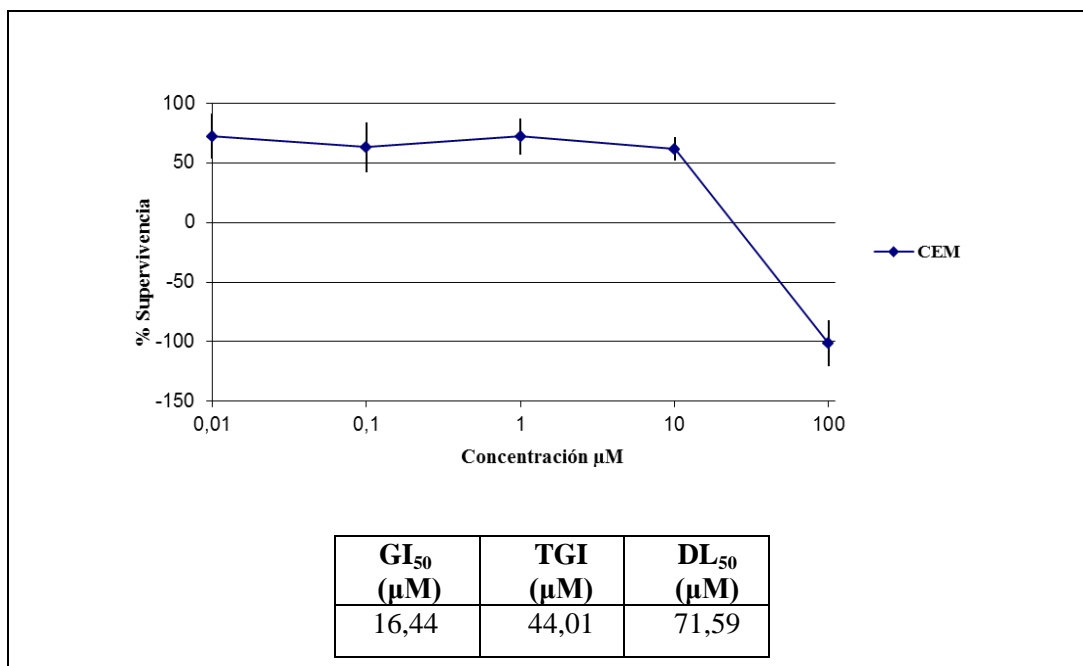


Figura 7: Curva dosis-respuesta del alcaloide Asp en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Asp a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC₅₀, TGI y GI₅₀.

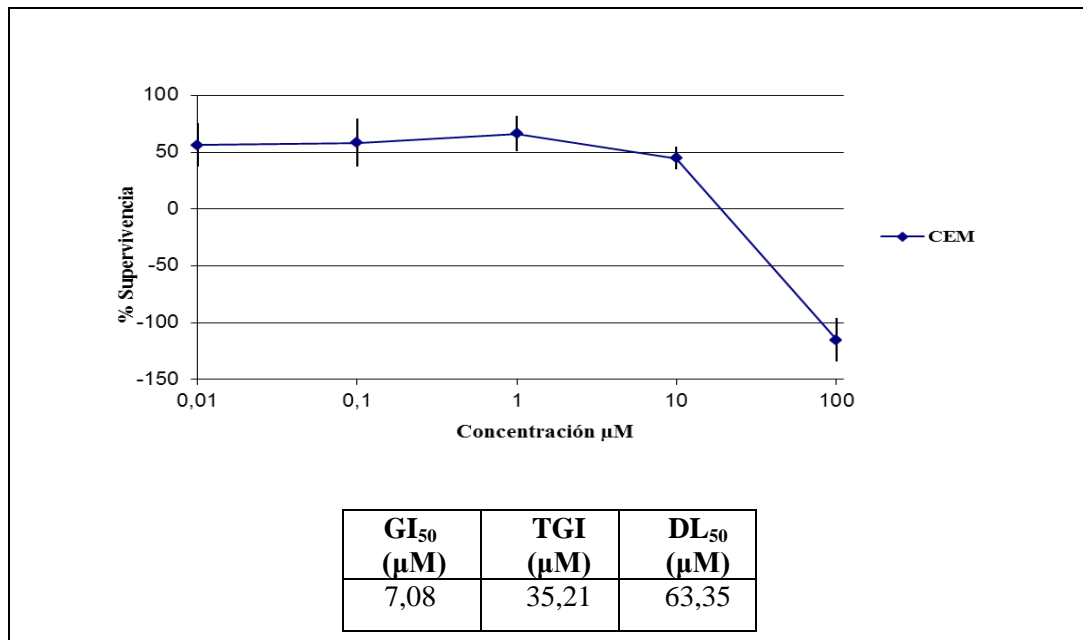


Figura 8: Curva dosis-respuesta del alcaloide Asd en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Asd a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC₅₀, TGI y GI₅₀.

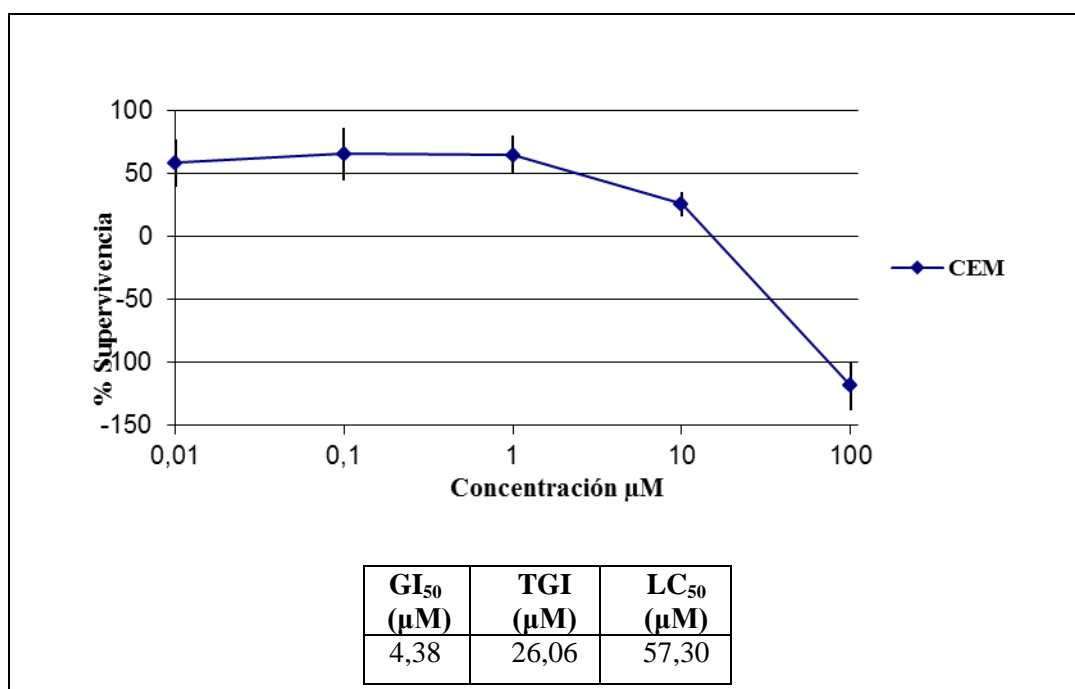


Figura 9: Curva dosis-respuesta del alcaloide Me en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Me a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

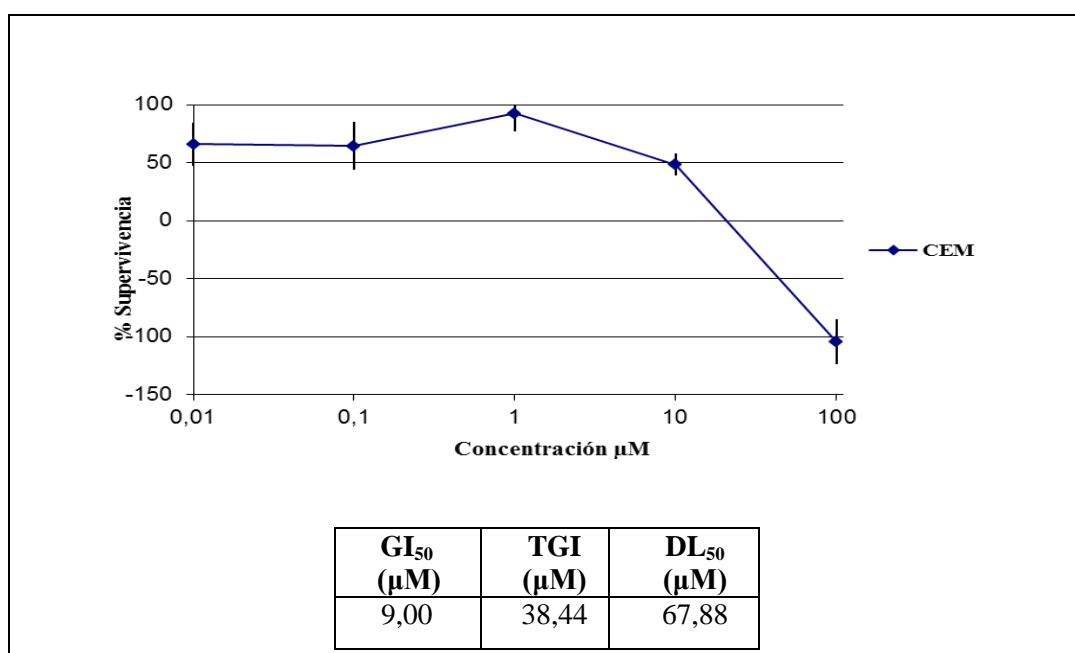


Figura 10: Curva dosis-respuesta del alcaloide Ge en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Ge a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

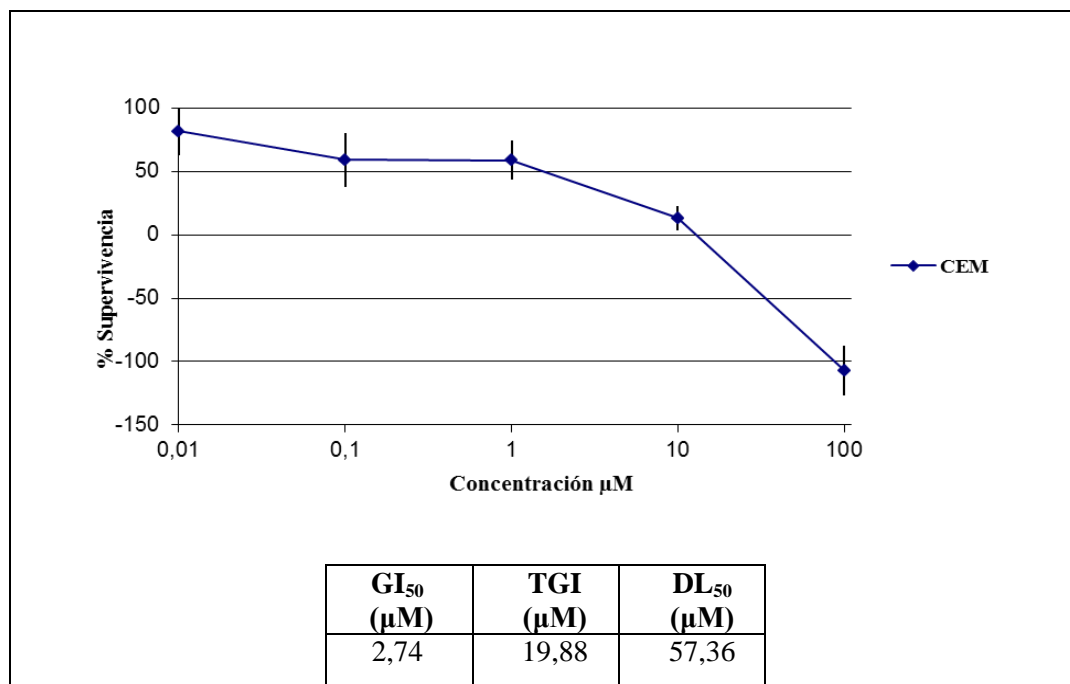


Figura 11: Curva dosis-respuesta del alcaloide Ca en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Ca a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

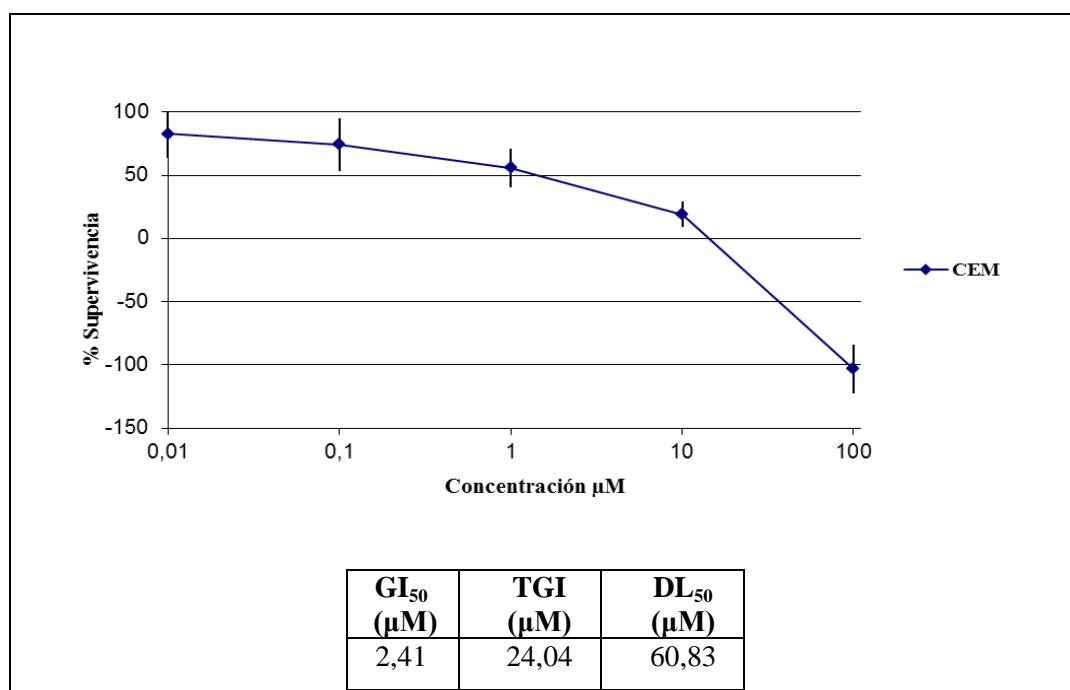


Figura 12: Curva dosis-respuesta del alcaloide Re en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Re a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

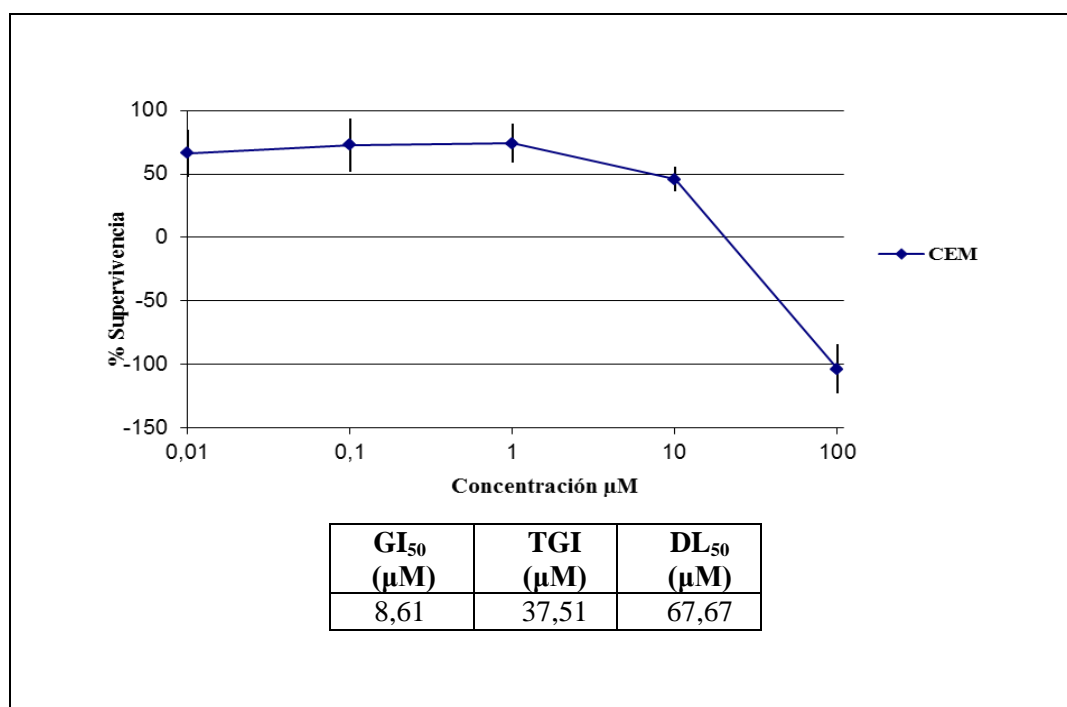


Figura 13: Curva dosis-respuesta de alcaloide LQ en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de LQ a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

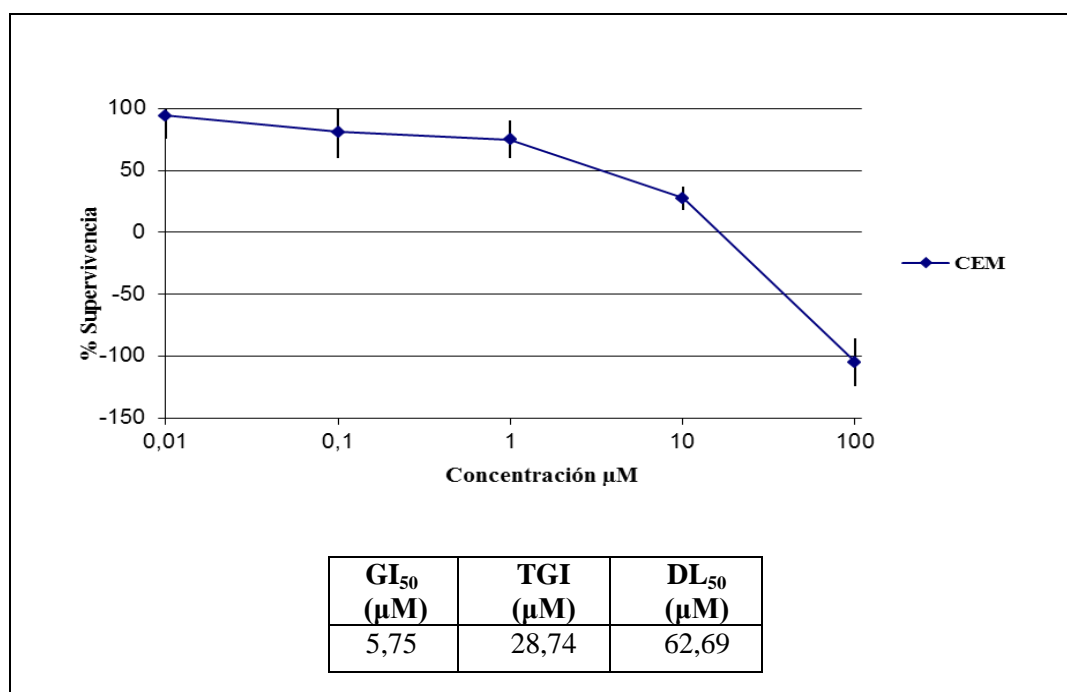


Figura 14: Curva dosis-respuesta del alcaloide Ci en línea celular CCRF-CEM. Se incubaron células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de Ci a concentración 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado. En la tabla se muestran los parámetros de citotoxicidad LC_{50} , TGI y GI_{50} .

2. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, se procedió a continuación a analizar si los alcaloides Ca y Re (los de mayor efecto citotóxico) afectaban a la viabilidad celular en cultivos de células CCRF-CEM induciendo en estas células un proceso de apoptosis o de necrosis. Con este fin se analizó mediante citometría de flujo el estado de las células tras el tratamiento con los compuestos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el kit de tinción conjunta con Anexina V – FITC e Ioduro de propidio. En los experimentos se evaluó la capacidad de inducir apoptosis de los alcaloides a diferentes concentraciones y tiempos de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 15-17. Las figuras muestran que ambos compuestos poseen capacidad para inducir apoptosis en los cultivos de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto.

La figura 15 muestra el resultado de un experimento representativo en el que las células se trataron durante 24 horas con los compuestos a concentración 40 μ M. Como muestra la figura, el análisis por citometría de flujo permite diferenciar células intactas (células Anexina V-FICT negativas, IP negativas, cuadrante A3), apoptóticas tempranas (células Anexina V-FICT positivas, IP negativas, cuadrante A4), apoptóticas tardías (células Anexina V-FICT positivas, IP positivas, cuadrante A2) y necróticas (células Anexina V-FICT negativas, IP positivas, cuadrante A1). Como puede observarse, ambos compuestos fueron capaces de inducir un aumento moderado en el número de células apoptóticas en el cultivo (2,3 % en las células control, 12,4 % en las tratadas con Ca y 10,6 % en las tratadas con Re).

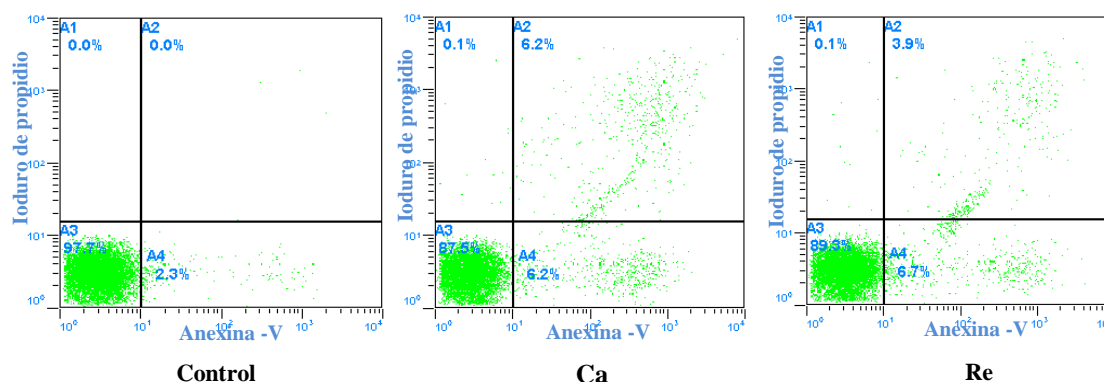


Figura 15: Los alcaloides Ca y Re son capaces de inducir apoptosis en células CCRF-CEM.

Las células se trataron con los alcaloides Ca y Re a concentración 40 μM durante 24 horas. Transcurrido este tiempo las células se analizaron por citometría de flujo mediante tinción conjunta con Anexina V-FITC e IP. La figura muestra el resultado de un experimento representativo. En los cuadrantes se observan: células intactas en A3, células necróticas IP (+) en A1 y células apoptóticas tempranas anexina V (+)/IP (-) y tardías IP (+)/anexina V (+) en A4 y A2 respectivamente.

La figura 16 muestra el efecto de la concentración de los alcaloides sobre su capacidad para inducir apoptosis. Con este fin las células se cultivaron en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones (12, 18, 24 y 40 μM) de los alcaloides Ca y Re durante 24 horas. Como puede observarse en la figura, la inducción de apoptosis es dependiente de la concentración de compuesto utilizada, mostrando incrementos significativos en el porcentaje de células apoptóticas con respecto al control a concentraciones de 18, 24 y 40 μM con ambos alcaloides. La figura también muestra que el alcaloide Ca tiene una mayor capacidad para inducir apoptosis que el alcaloide Re.

La figura 17 muestra el efecto del tiempo de exposición a los alcaloides sobre su capacidad para inducir apoptosis. Con este fin las células se trataron durante 4, 12, 24 ó 48 horas con los alcaloides a concentración 40 μM . La figura muestra que en el caso del Re el porcentaje de células apoptóticas en el cultivo aumenta progresivamente hasta las 24 horas de exposición al compuesto y declina ligeramente a tiempos más largos. En el caso del Ca, el mayor porcentaje de células apoptóticas en los cultivos se alcanzó a las 4 horas de exposición al compuesto (17,38 % \pm 1,76) declinando ligeramente a tiempos más prolongados. Estos resultados sugieren que las células metabolizan los compuestos, disminuyendo su capacidad para inducir apoptosis a medida que disminuye su concentración, y también que este metabolismo es más rápido en el caso de Ca que en el del Re.

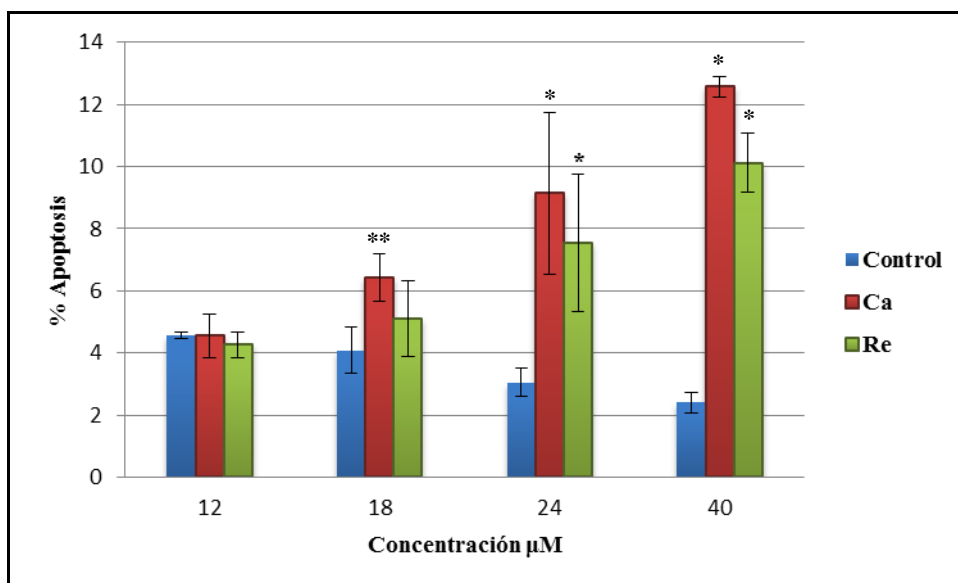


Figura 16: Efecto de la concentración de los alcaloides Ca y Re sobre su capacidad de inducir apoptosis en células CCRF-CEM. Las células se trataron con los alcaloides Ca y Re durante 24 horas en ausencia (control) o presencia de los compuestos a concentraciones de 12, 18, 24 y 40 μM . Tras la incubación las células se analizaron por citometría de flujo mediante tinción conjunta con Anexina V-FITC e IP. Los resultados se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos por duplicado. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ indican que existen diferencias significativas con respecto al control.

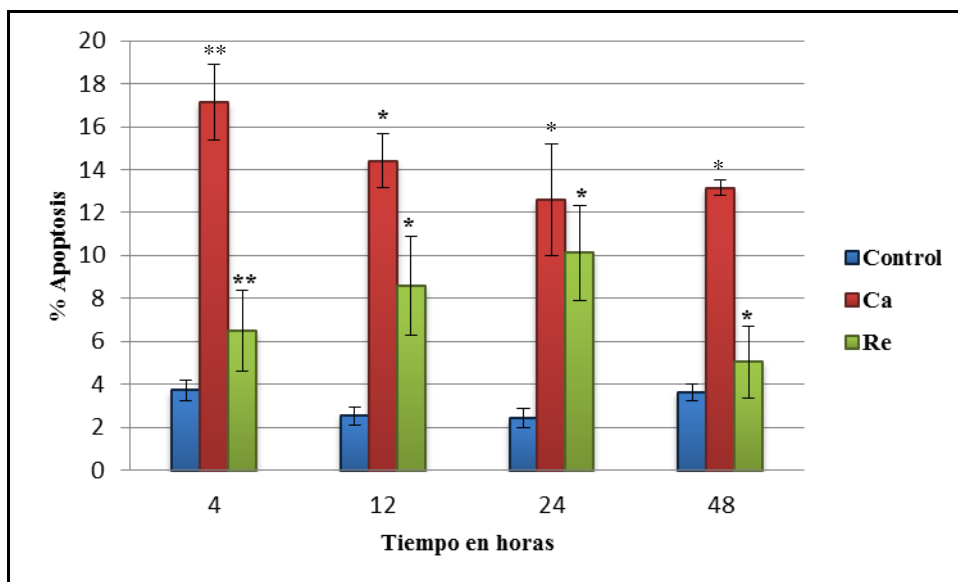


Figura 17: Efecto del tiempo de exposición a los alcaloides Ca y Re sobre su capacidad para inducir apoptosis en células CCRF-CEM. Las células se trataron en ausencia (control) o presencia de los alcaloides Ca y Re a concentración de 40 μM durante 4, 12, 24 y 48 horas. Tras la incubación las células se analizaron por citometría de flujo mediante tinción conjunta con Anexina V-FITC e IP. Los resultados se expresan como la media \pm SD (Desviación estándar) de 3 experimentos independientes por duplicado. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ indica que existen diferencias significativas respecto al control.

3. ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR

Muchos compuestos citotóxicos antitumorales inducen alteraciones en el transcurso del ciclo celular. Por ello evaluamos a continuación el efecto de los alcaloides Ca y Re sobre la distribución del ciclo celular en cultivos de células CCRF-CEM. Con este fin se fijaron y permeabilizaron con etanol células CCRF-CEM incubadas durante diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas) en presencia de los alcaloides Ca y Re a concentración 40 μ M. Una vez fijadas, las células se tiñeron con ioduro de propidio, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos, y se analizaron por citometría de flujo. Para los análisis se seleccionaron las células vivas en un gráfico FSC/SSC. Los agregados de dos o más células se descartaron mediante un dot-plot FL-3 vs pico de la señal en FL-3. Por último, para analizar la distribución del ciclo celular se representaron las células seleccionadas en un histograma FL-3/nº de células. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18 y 19.

La figura 18 muestra el resultado obtenido en un ensayo representativo al analizar por citometría de flujo la distribución del ciclo celular en cultivos de células CCRF-CEM tratados con los alcaloides Ca y Re a concentración 40 μ M durante 24 horas. De este análisis se obtienen los porcentajes de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular. La figura 19 muestra los resultados (Media \pm SD) obtenidos tras la realización de al menos 3 experimentos independientes por duplicado. Como cabe esperar para compuestos inductores de apoptosis, la figura muestra un aumento progresivo en el porcentaje de células subdiploides (sub G1) tras los tratamientos con Ca. Además, este alcaloide Ca provoca un pequeño aumento en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G₀/G₁ tras 24 horas de tratamiento. Este incremento desaparece a medida que aumenta la duración del tratamiento y se acompaña con una disminución progresiva del porcentaje de células en las fases S y G₂/M. Este resultado es semejante al descrito con el alcaloide Berbamina en células de leucemia basofílica KU812 [84] y sugiere que el alcaloide Ca provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G₀/G₁ y que las células mueren en esta fase. Sin embargo, en las condiciones del estudio no se han observado modificaciones en la distribución del ciclo celular tras los tratamientos con el

alcaloide Re, lo que sugiere que su efecto no es específico de ninguna de las fases del ciclo celular. Para confirmar estos resultados será necesario repetir estos experimentos en cultivos de células sincronizadas.

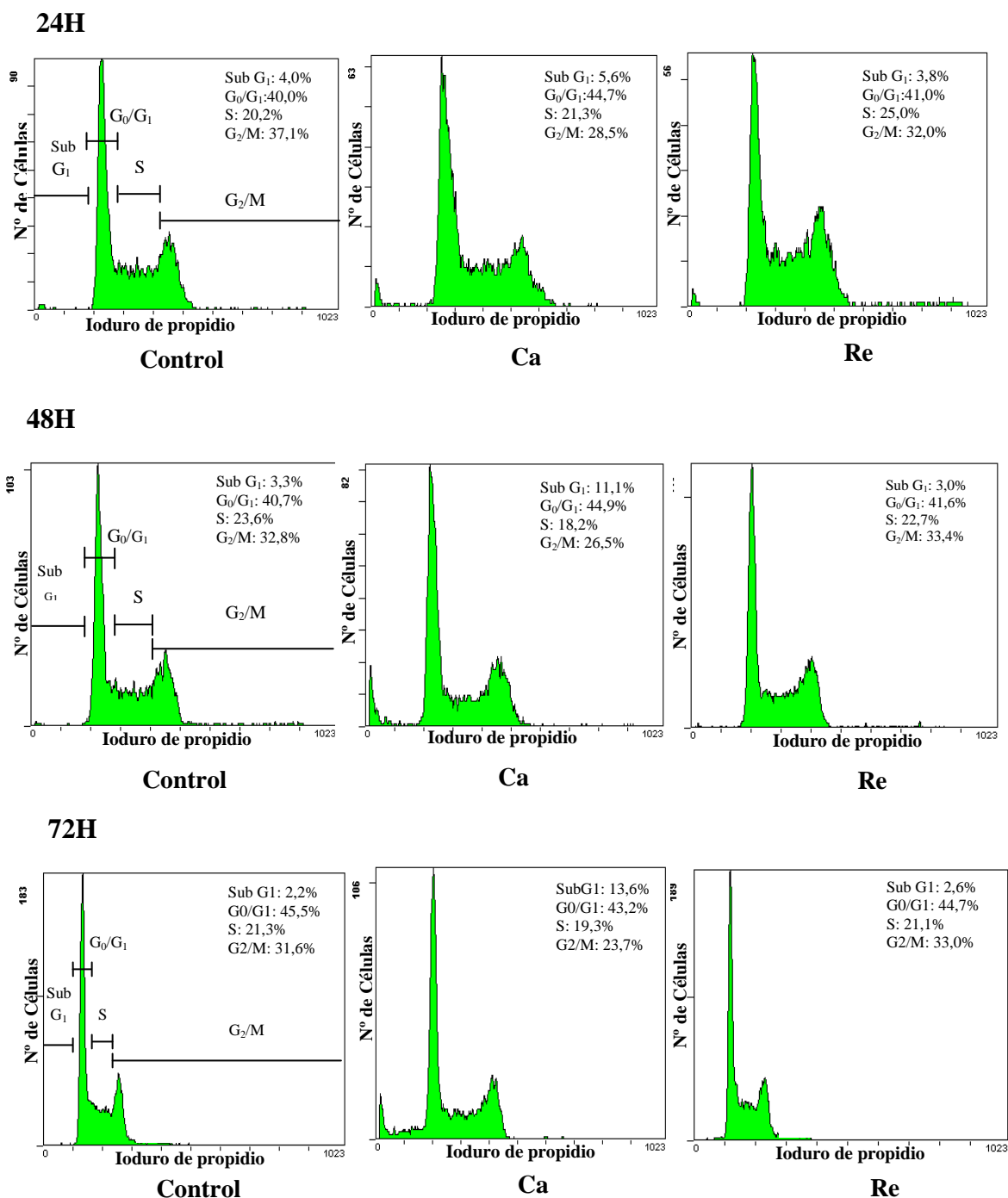


Figura 18: Efecto de los alcaloides Ca y Re sobre la distribución del ciclo celular en cultivos de células CCRF-CEM. Las células se trataron en ausencia (control) o presencia de los alcaloides Ca y Re a concentración de 40 μ M durante 24, 48 ó 72 horas. Tras la incubación las células se analizaron por citometría de flujo con IP. Los histogramas n° de células/IP (cantidad de DNA) reflejan el porcentaje de células en las distintas fases (sub G₁, G₀/G₁, S y G₂/M) del ciclo celular. El % de células en cada fase del ciclo se determinó con el EXPO 32 ADC Analysis System. La figura muestra el resultado de un experimento representativo.

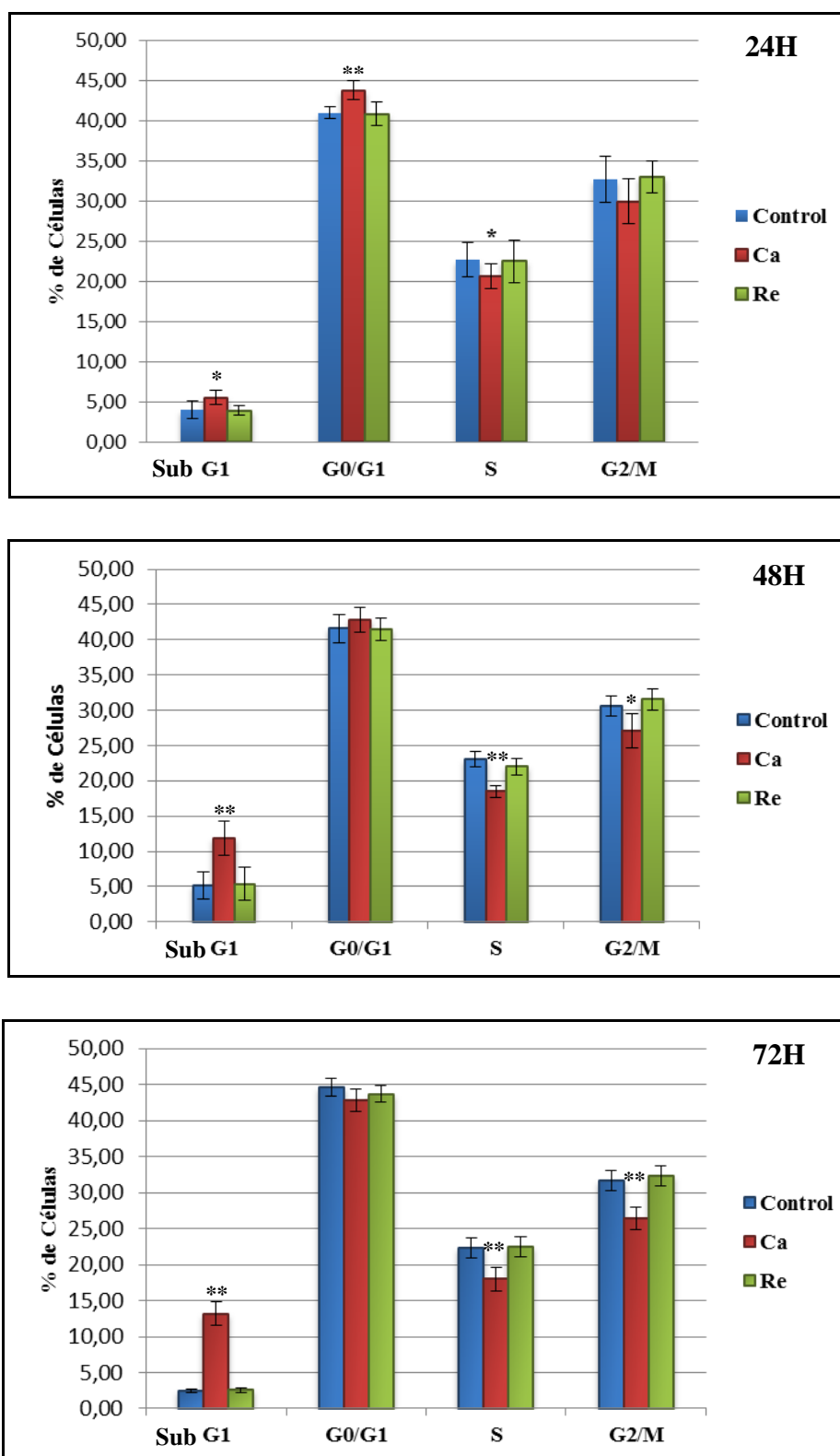


Figura 19: Efecto de los alcaloides Ca y Re sobre la distribución del ciclo celular en cultivos de células CCRF-CEM. Las células se trataron en ausencia (control) o presencia de los alcaloides Ca y Re a concentración de 40 μ M durante 24, 48 ó 72 horas. Tras la incubación las células se analizaron por citometría de flujo con IP. El % de células en cada fase del ciclo se determinó con el EXPO 32 ADC Analysis System. Los resultados están expresados como media \pm SD de 3 experimentos independientes realizado por duplicado. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ indican diferencias significativas con respecto al control.

DISCUSIÓN

Los alcaloides de estructura quinolílica e indólica ejercen un amplio abanico de acciones biológicas entre las que se incluyen su actividad antiplasmodica, antimicrobiana, antitumoral, analgésica, viricida y antioxidante. Dadas sus propiedades farmacológicas en este trabajo se han evaluado los efectos de ocho alcaloides de estructura quinolílica e indólica, extraídos y purificados de plantas peruanas amazónicas, sobre la línea celular de leucemia linfoblástica CCRF-CEM. Nuestros resultados muestran que los ocho compuestos poseen un moderado efecto citotóxico, con valores de GI_{50} comprendidos entre 2,41 y 16,44 μM , y de LC_{50} comprendidos entre 57,30 y 71,59 μM . Estos valores son más bajos que los encontrados con otros alcaloides de estructura similar en estudios afines. Así, por ejemplo, la berbamina (bisbenzylisoquinolina), un alcaloide aislado de *Berberis amurensis*, tiene actividad citotóxica y antiproliferativa en células de leucemia K562 y KU812, con valores de IC_{50} de 5,227 mcg/mL y 750 mcg/mL respectivamente [85,86], de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-435S, con valores de IC_{50} de 13,7 mM y 25,0 μM respectivamente [87] y en células de hepatoma SMMC7721, con valores de IC_{50} de 22,8 g/mL [84]; la mitrafilina (oxindol pentacíclico), un alcaloide aislado de *Uncaria tomentosa*, posee a su vez actividad citotóxica y antiproliferativa en células de glioma GAMG, con valores de IC_{50} de 12,3 μM , en células de neuroblastoma SKN-BE(2), con valores de IC_{50} de 20 μM [88], en células de sarcoma de Ewing MHH-ES-1, con valores de IC_{50} de 17,15 μM , y en células de cáncer de mama MT-3, con valores de IC_{50} de 11,80 μM [89]; por último, la corynantheidina (oxindol), un alcaloide aislado de *Uncaria macrophylla*, posee actividad citotóxica y antiproliferativa en células de leucemia promielítica HL-60, con valores de IC_{50} de 13,96 μM , y en células de cáncer de colón SW480 con valores de IC_{50} de 23,28 μM [90]. Estos resultados son prometedores y ponen de manifiesto la necesidad de realizar nuevos ensayos de citotoxicidad en líneas celulares adicionales con los compuestos evaluados en este trabajo.

Se ha descrito que los compuestos con actividad citotóxica pueden ejercer sus acciones mediante la inducción de apoptosis, afectando al ciclo celular o actuando sobre ambos procesos. Nuestros resultados muestran que de los ocho

alcaloides evaluados, como mínimo los dos más activos (Ca, $GI_{50} = 2,75 \mu M$ y Re, $GI_{50} = 2,41 \mu M$) son capaces de inducir apoptosis, de forma dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto, en cultivos de células CCRF-CEM. Este resultado es semejante al observado con múltiples agentes antineoplásicos, entre ellos algunos alcaloides utilizados actualmente en clínica como la viscristina o la doxorubicina, que desencadenan en las células tumorales un proceso de apoptosis típico que se acompaña de condensación celular, deslocalización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática, activación de caspasas, condensación de la cromatina y degradación del DNA-nucleosomal. Además, en el caso de la berbamina se ha podido demostrar que su capacidad para inducir apoptosis está relacionada con su capacidad para reprimir la expresión de la proteína de fusión BCR/ABL, activar la caspasa 3, disminuir el potencial de membrana mitocondrial (MTP) y aumentar la actividad de Smad3 (caracterizada por un aumento en los niveles de ARNm y fosfoproteínas) [84-87]. A su vez la berberina (isoquinolina), un alcaloide aislado de rizomas y raíces de especies como *Berbís*, *Coptis* e *Hydrastis*, ejerce su efecto apoptótico a través de la supresión de la ruta NF- κ B mediante inhibición directa de la quinasa Ik- κ , seguida de su fosforilación y degradación, lo que impide la translocación nuclear de p65 y su unión al ADN. Como resultado de la supresión de la actividad NF- κ B, la berberina disminuye los niveles de expresión genes antiapoptóticos (Bcl-XL, survivina, IAP1, IAP2 y cFLIP) y de genes promotores de la inflamación (COX-2), la proliferación (ciclina D1) y la metástasis tumoral (MMP-1,-2 y -9) [62, 63, 91 y 92]. Por último, otros estudios realizados con alcaloides oxindólicos, como la pteropodina y la uncarina F extraídas de *Uncaria tomentosa*, han mostrado que estos compuestos inducen porcentajes elevados de apoptosis, que en células CEM no se pueden suprimir sobreexpresando bcl-2 [72]. Por ello, en el futuro será necesario realizar experimentos adicionales que contribuyan a esclarecer el mecanismo molecular por el que los alcaloides Ca y Re inducen apoptosis.

Como cabe esperar para compuestos inductores de apoptosis, los análisis del ciclo celular realizados en este trabajo muestran un aumento progresivo en el porcentaje de células subdiploides (sub G1) en cultivos de células CCRF-CEM

tras su tratamiento con el alcaloide Ca. Este aumento se acompaña de una pequeña elevación en el porcentaje de células que se encuentran en la fase G_0/G_1 y una disminución progresiva del número de células en las fases S y G2/M. Este resultado sugiere el bloqueo del ciclo celular en la fase G_0/G_1 y la muerte de las células en esta fase y es semejante al observado en otros trabajos realizados con los alcaloides berbamina, pteropodina y uncarina F, que también bloquean el ciclo en fase G_0/G_1 [72 y 84], con activación de Smad 3, disminución de c-Myc y de la ciclina D1 y aumento de p21 [85-86]. Para analizar si estas proteínas están también relacionadas con el bloqueo del ciclo inducido por Ca será necesaria la realización de experimentos adicionales.

CONCLUSIONES

1. Se han evaluado los efectos de ocho alcaloides de estructura quinolílica e indólica sobre la línea celular de leucemia linfoblástica CCRF-CEM. Los ocho compuestos evaluados poseen actividad citotóxica en esta línea, con valores de GI_{50} comprendidos entre 2,41 y 16,44 μM , de TGI entre 19,88 y 44,01 μM y de LC_{50} entre 57,30 y 71,59 μM .
2. Entre los compuestos evaluados los alcaloides Ca y Re son los de mayor toxicidad y el alcaloide Asp el de menor.
3. En cultivos celulares de células CCRF-CEM los alcaloides Ca y Re inducen un proceso de muerte celular por apoptosis que es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto.
4. En cultivos celulares de células CCRF-CEM el tratamiento con el alcaloide Ca bloquea el ciclo celular en fase G_0/G_1 .
5. En cultivos celulares de células CCRF-CEM no se han observado modificaciones en la distribución del ciclo celular tras los tratamientos con el alcaloide Re, lo que sugiere que su efecto no es específico de ninguna de las fases del ciclo celular.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Cancer.net, en español. Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) infantil. Consulta junio del 2011.
- 2 American Cancer Society. Detailed Guide. Leukemia- Acute Lymphocytic. Consulta junio del 2011.
- 3 Instituto Nacional del Cáncer-INCA. Ministerio da Saúde-Rio de Janeiro. Consulta junio del 2011.
- 4 Leukemia & Lymphoma Society. Folleto Leucemia Linfoblástica aguda. Actualizado Junio 2010.
- 5 Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la salud de EEUU. Información general sobre la leucemia Linfoblástica aguda en adultos. Consulta julio del 2011.
- 6 Merino, Anna. Leucemias Agudas. *Ed. Cont. Lab. Clín.*; 2007,11:48-55.
- 7 Fabrizio Pane, Mariano Intrieri, Concetta Quintarelli, Barbara Izzo, Giada Casadei Muccioli and Francesco Salvatore. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*. December 2002, Volume 21, Number 56, Pages 8652-8667.
- 8 Mejía Aranguré Juan Manuel. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. *Revista de Hematología* Vol. 11, Supl. 1, Abril-Mayo 2010; p. 35-36
- 9 Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2321-33.
- 10 Pui CH , LL Robison , Mire. La leucemia linfoblástica aguda. *Lancet* 2008 Mar 22; 371 (9617) :1030-43.
- 11 Collins-Underwood JR, Mullighan CG. Genetic alterations targeting lymphoid development in acute lymphoblastic leukemia. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94:171-96.
- 12 Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, et al.: Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 87 (2): 423-38, 1996.

- 13 Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al.: Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41 (11): 1243-6, 2009.
- 14 Bartley K, Metayer C, Selvin S, Ducore J, Buffler P. Diagnostic X-rays and risk of childhood leukaemia. *Int J Epidemiol.* 2010 Dec;39(6):1628-37.
- 15 Glass DC, Gray CN, Jolley DJ, Gibbons C, Sim MR, Fritschi L, Adams GG, Bisby JA, Manuell R. Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiology.* 2003 Sep;14(5):569-77.
- 16 Chang JS. Parental smoking and childhood leukemia. *Methods Mol Biol.* 2009;472:103-37.
- 17 Ching-Hon Pui, M.D., and William E. Evans, Pharm.D. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339:605-615.
- 18 Belson M, Kingsley B, Holmes A.. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect.* 2007 Jan;115(1):138-45.
- 19 Guía de Práctica Clínica. Diagnostico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda. Instituto Mexicano del Seguro Social. 2009. Pág. 12-23.
- 20 Ching-Hon Pui, M.D., and William E. Evans, Pharm.D. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2006; 354:166-178.
- 21 Rodilla Calvelo, Francisco. Boletín Oncológico del Área Sanitaria de Teruel. Mecanismos de acción Antitumoral. Actualizado 07/08/2011.
- 22 Avramis VI, Panosyan EH. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(4):367-93.
- 23 Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Oncologist.* 2007 Aug; 12(8):991-8.

- 24 Wetzler M, Sanford BL, Kurtzberg J, DeOliveira D, Frankel SR, Powell BL, Kolitz JE, Bloomfield CD, Larson RA. Effective asparagine depletion with pegylated asparaginase results in improved outcomes in adult acute lymphoblastic leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9511. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4164-7.
- 25 Bostrom B, Erdmann G. Cellular pharmacology of 6-mercaptopurine in acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1993 Feb;15(1):80-6.
- 26 Majda K, Lubecka K, Kaufman-Szymczyk A, Fabianowska-Majewska K. Clofarabine (2-chloro-2'-fluoro-2'-deoxyarabinosyladenine)--biochemical aspects of anticancer activity. *Acta Pol Pharm*. 2011 Jul-Aug;68(4):459-66.
- 27 Pession A, Masetti R, Kleinschmidt K, Martoni A. Use of clofarabine for acute childhood leukemia. *Biologics*. 2010 Jun 24;4:111-8.
- 28 Ghanem H, Jabbour E, Faderl S, Ghandhi V, Plunkett W, Kantarjian H. Clofarabine in leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2010 Feb;3(1):15-22.
- 29 Naik S. Towards personalized medicine - the role of methotrexate. *Indian J Med Res*. 2011 Mar;133(3):253-5.
- 30 Carol H, Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Keir ST, Watkins A, Smith MA, Lock RB. Initial testing of topotecan by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 May;54(5):707-15.
- 31 Vega-Avila, Elisa; Velasco-Lezama, Rodolfo; Jiménez-Estrada, Manuel. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica*. Volumen 31 No. 3 Julio-Septiembre 2006. p. 97-111.
- 32 Lee HJ, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer*. 2011 Apr 15;117(8):1583-94.
- 33 Koo HH. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Korean J Pediatr*. 2011 Mar;54(3):106-10.

- 34 Hockenbery David. Defining Apoptosis. *American journal of Pathology*, Vol. 146, No. 1, January 1995. p. 16-19.
- 35 Hengartner Michael O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000, vol 407.p.770-776.
- 36 Arango Prado, María del Carmen; Llanes Fernández, Leticia; Díaz Román, Tomás y Faxas García, María Elena. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol* 1997;13(2):126-134.
- 37 R. Ramírez Chamond, J. Carracedo Añón, C. Moreno Aguilar y F. Guerra Pasadas. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Immunol Clin*, Diciembre 1999 Vol. 14, Núm. 6, pp. 367-374
- 38 Plano Amatriain, Daniel. Memoria para grado de doctor: Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Nuevos Derivados Organoselénicos con actividad citotóxica y apoptótica. Universidad de Navarra-Facultad de Ciencias. Pamplona 2010.p. 1-316.
- 39 Debatin KM, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2002 Dec 12;21(57):8786-803.
- 40 Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther*. 2010 Mar;9(6):417-22.
- 41 Letai A. Puma strikes Bax. *J Cell Biol*. 2009 Apr 20;185(2):189-91.
- 42 Moroy G, Martin E, Dejaegere A, Stote RH. Molecular basis for Bcl-2 homology 3 domain recognition in the Bcl-2 protein family: identification of conserved hot spot interactions. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26;284(26):17499-511.
- 43 Flanagan L, Sebastià J, Tuffy LP, Spring A, Lichawska A, Devocelle M, Prehn JH, Rehm M. XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis. *Cell Death Dis*. 2010 Jun 3;1(6):e49.
- 44 Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2603-14.

- 45 Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008 Apr 1;111(7):3322-30.
- 46 Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4798-811.
- 47 Katrien Vermeulen, Dirk R. Van Bockstaele and Zwi N. Berneman The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003, 36, 131–14
- 48 Stein, Gary S; Pardee, Arthur B. Cell Cycle and Growth Control- Biomolecular Regulation and Cancer. Chapter I: Cell Fates. 2. Edition – 2004.
- 49 Roberts, MF.; Wink, M. Introduction. In “Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications”, Roberts, M.F., and Wink M, (eds). Plenum Press, New York; 1998; 1-7.
- 50 Waterman PG. Chemical taxonomy of alkaloids. In “Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications”, Roberts, M.F., and Wink M, (eds). Plenum Press, New York; 1998; 87-107.
- 51 Cordell, G.A.; Quinn-Beattie, M.L. and FRNAsworth, N.R. Phytotherapy Research, 2001, 15,183-205.
- 52 Lucas DM, Still PC, Pérez LB, Grever MR, Kinghorn AD. Potential of plant-derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma. *Curr Drug Targets*. 2010 Jul;11(7):812-22.
- 53 Ernesto Fattorusso and Orazio Taglialatela-Scafati. Moden Alkaloids – Structure, Isolation, *Synthesis and Biology*. 2008 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim. Pag. 25-52.
- 54 E A Kolb and P G Steinherz. A new multidrug reinduction protocol with topotecan, vinorelbine, thiotepa, dexamethasone, and gemcitabine for relapsed or refractory acute leukemia. *Leukemia* (2003) 17, 1967–1972.
- 55 By Hagop M. Kantarjian, Miloslav Beran, Amy Ellis, Leonard Zwellling, Susan O’Brien, Lorraine Cazenave, Charles Koller, Mary Beth Rios, William Plunkett, Michael J. Keating, and Elihu H. Estey. Phase I Study of Topotecan, A New

- Topoisomerase I Inhibitor, in Patients With Refractory or Relapsed Acute Leukemia. *Blood*, Vol81, No 5 (March 1), 1993: pp 1146-1 151.
- 56 Hernan Carol, PhD, Peter J. Houghton, PhD, Christopher L. Morton, BS, E. Anders Kolb, MD, Richard Gorlick, MD, C. Patrick Reynolds, MD, PhD, Min H. Kang, PharmD, John M. Maris, MD, Stephen T. Keir, PhD, Amy Watkins, MS, Malcolm A. Smith, MD, PhD, and Richard B. Lock, PhD. Initial Testing of Topotecan by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 May; 54(5): 707–715.
- 57 Rowinsky, Eric K. The development and Clinical Utilty of the Taxane Class of Antimicrotubule ChemotreraPy Agents. *Annu. Rev. Med.* 1997. 48:353-74
- 58 Abal M.; Andreu J.M.; Barasoain I. Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. *Current Cancer Drug Targets*, Volume 3, Number 3, June 2003, pp. 193-203(11)
- 59 Rosaria M.R. Gangemi, Barbara Santamaria, Antonio Bargellesi, Elisabetta Cosulich, Marina Fabbi. Late apoptotic effects of taxanes on K562 erythroleukemia cells: Apoptosis is delayed upstream of caspase-3 activation. *International Journal of Cancer* Volume 85, Issue 4, pages 527–533, 15 February 2000.
- 60 Peter J. Gibbs and Kenneth R. Seddon. "Berberine". *Alternative Medicine Review*. April 2000; 5 (2): 175–7.
- 61 Birdsall TC, Kelly GS "Berberine: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants". *Alternative Medicine Reviews*. 1997; 2 (2): 94–103.
- 62 Lin CC, Kao ST, Chen GW, Ho HC, Chung JG. Apoptosis of human leukemia HL-60 cells and murine leukemia WEHI-3 cells induced by berberine through the activation of caspase-3. *Anticancer Res*. 2006 Jan-Feb;26(1A):227-42.
- 63 Jin L, Liao HJ, Zhang MY, Liu QY, Wang YF. Effect of berberine on the differentiation and apoptosis of K562 cell line *Zhong Yao Cai*. 2009 Mar;32(3):384-8.
- 64 Lin CC, Lin SY, Chung JG, Lin JP, Chen GW, Kao ST. Down-regulation of cyclin B1 and up-regulation of Wee1 by berberine promotes entry of leukemia cells into the G2/M-phase of the cell cycle. *Anticancer Res*. 2006 Mar-Apr;26(2A):1097-104.
- 65 Zhang X, Gu L, Li J, Shah N, He J, Yang L, Hu Q, Zhou M. Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent

- apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9895-904.
- 66 Jesús G. Díaz; José Gavian Sazatomil, Matías López Rodriguez, Lastenia Ruíz y Gabriel Vargas Arana. Five New Alkaloids from the leaves of *Remijia peruviana*. *J. Nat. Food* 2004, 67, 1667-1671.
- 67 Marycleuma Campos Henrique; Sergio Massayoshi Nunomura; Adrian Martin Pohlit. Alcaloides indólicos de cascás de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. *Quím. Nova* vol.33 no.2 São Paulo 2010.
- 68 Sosa Amay, Frida Enriqueta. Estudio fitoquímico de la corteza de la raíz de *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg. con actividad antiplasmodial . Lima, 2009.Tesis (Mg.) Mención: Química Orgánica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química. Escuela de Post-Grado, 2009.
- 69 Wilfredo Ruiz Mesía. Tesis Doctoral: Alcaloides indólicos antiparasitarios de especies de la Amazonía Peruana. Departamento de Química Orgánica Universidad de Lagunas-Instituto de Productos Naturales y Agrobiología Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Lagunas Mayo 2008.
- 70 Matías Reina, Wilfredo Ruiz-Mesia, Lastenia Ruiz-Mesia, Rafael Martínez-Díaz, and Azucena González-Coloma. Indole Alkaloids from *Aspidosperma rigidum* and *A. schultesii* and their Antiparasitic Effects. *Z. Naturforsch.* 66 c, # – # (2011).
- 71 James E., Williams. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de gato and Sangre de grado. *Altern Med Rev.* 2001 Dec;6(6):567-79.
- 72 Bacher N, Tiefenthaler M, Sturm S, Stuppner H, Ausserlechner MJ, Kofler R, Konwalinka G. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G₀/G₁-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2006 Mar;132(5):615-22.
- 73 Wurm M , Kacani L , Laus G , Keplinger K , Dierich MP . Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. *Planta Med.* 1998 Dec;64(8):701-4.

- 74 García Prado E, García Gimenez MD, De la Puerta Vázquez R, Espartero Sánchez JL, Sáenz Rodríguez MT. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine*. 2007 Apr;14(4):280-4. Epub 2007 Feb 12.
- 75 Reyes-Chilpa Ricardo, Rivera Jesús, Oropeza Martha, Mendoza Pilar, Amekraz Badia, Jankowski Christopher and Campos Maria. Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium. *Biol. Pharm. Bull.* 27(10) 1617—1620 (2004) 1617
- 76 Gonzales, Gustavo F and Valerio, Luis G. Medicinal plants from Peru: A review of plants as potential agents against cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2006, 6, 429-444
- 77 Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Avila TV, Soley Bda S, Rivero AJ, Aguilar JL, Acco A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *J Ethnopharmacol.* 2010 Jul 6;130(1):127-33. Epub 2010 May 6.
- 78 Pilarski R , Filip B , Wietrzyk J , Kuraś M , Gulewicz K Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*. 2010 Dec 1;17(14):1133-9
- 79 Meléndez-Gómez, C., Kouznetsov, V. Alcaloides quinolínicos: importancia biológica y esfuerzos sintéticos. *Universitas Scientiarum Revista de la Facultad de Ciencias* Vol. 10, N° 2, 5-18. Julio-diciembre 2005.
- 80 Genne P, Duchamp O, Solary E, Pinard D, Belon JP, Dimanche-Boitrel MT, Chauffert B. Comparative effects of quinine and cinchonine in reversing multidrug resistance on human leukemic cell line K562/ADM. *Leukemia*. 1994 Jan;8(1):160-4.
- 81 Wilfredo Ruíz Mesía. DEA: Alcaloides quinolínicos e indólicos de especies de la Amazonía Peruana. Departamento de Química Orgánica Universidad de Lagunas-Instituto de Productos Naturales y Agrobiología Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Lagunas Octubre 2005.

- 82 Lastenia Ruiz –Mesia; Wilfredo Ruíz-Mesía; Matías Reina; Rafael Martinez-Díaz, Concepción de Inés, Ana Guadaño, y Azucena González-Coloma. Bioactive Cinchona Alkaloids from *Remijia peruviana*. *J Agric. Food Chem* 2005, 53, 1921-1926.
- 83 Wang L, Chen GY, Han CR, Yuan Y, Yang B, Zhang Y, Wang J, Zhong XQ, Huang X. Two novel alkaloids from the stem of *Saprosma hainanense* and their cytotoxic activities in vitro. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2011;59(3):338-40.
- 84 Wang GY, Zhang JW, Lü QH, Xu RZ, Dong QH. Berbamine induces apoptosis in human hepatoma cell line SMMC7721 by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007 Apr;8(4):248-55.
- 85 Wu D, Lin MF, Zhao XY. Effects of berbamine on K562 cells and its mechanisms in vitro and in vivo. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005 Jun;13(3):373-8.
- 86 Liang Y, Qiu X, Xu RZ, Zhao XY. Berbamine inhibits proliferation and induces apoptosis of KU812 cells by increasing Smad3 activity. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011 Jul;12(7):568-74.
- 87 Wang S, Liu Q, Zhang Y, Liu K, Yu P, Liu K, Luan J, Duan H, Lu Z, Wang F, Wu E, Yagasaki K, Zhang G. Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action. *Mol Cancer*. 2009 Oct 1;8:81.
- 88 García Prado E, García Gimenez MD, De la Puerta Vázquez R, Espartero Sánchez JL, Sáenz Rodríguez MT. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine*. 2007 Apr;14(4):280-4. Epub 2007 Feb 12.
- 89 García Giménez D, García Prado E, Sáenz Rodríguez T, Fernández Arche A, De la Puerta R. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark on human Ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. *Planta Med*. 2010 Feb;76(2):133-6. Epub 2009 Sep 1.
- 90 Wang K, Zhou XY, Wang YY, Li MM, Li YS, Peng LY, Cheng X, Li Y, Wang YP, Zhao QS. Macrophyllonium and macrophyllines A and B, oxindole alkaloids from *Uncaria macrophylla*. *J Nat Prod*. 2011 Jan 28;74(1):12-5. Epub 2010 Nov 11.

- 91 Pandey MK, Sung B, Kunnumakkara AB, Sethi G, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Berberine modifies cysteine 179 of IkappaBalpha kinase, suppresses nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5370-9.
- 92 Lin JP, Yang JS, Wu CC, Lin SS, Hsieh WT, Lin ML, Yu FS, Yu CS, Chen GW, Chang YH, Chung JG. Berberine induced down-regulation of matrix metalloproteinase-1, -2 and -9 in human gastric cancer cells (SNU-5) in vitro. *In Vivo.* 2008 Mar-Apr;22(2):223-30.